



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Ciencias

**MICROSCOPIA COMPARADA DE LA
EPIDERMIS FOLIAR ABAXIAL DE
Commelina coelestis Willd. (Commelinaceae)
PROCESADA MEDIANTE NUEVE DISTINTAS
TÉCNICAS HISTOLÓGICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

MAGDALENA MERCADO ESCUTIA



**TUTORA:
DRA. AURORA ZLOTNIK ESPINOSA
COTUTORA:
M.F.P. ANA ISABEL BIELER ANTOLÍN**

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Mercado
Escutia
Magdalena
56-31-67-12
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
76278527

2. Datos del tutor

Dra
Aurora
Zlotnik
Espinosa

3. Datos del cotutor

MFP
Ana Isabel
Bieler
Antolín

4. Datos del sinodal 1

M en C
Rosenda Margarita
Ponce
Salazar

5. Datos del sinodal 2

Dra
Guillermina
Murguía
Sánchez

6. Datos del sinodal 3

Dra
Marcela Esperanza
Aguilar
Morales

7. Datos del trabajo escrito

Microscopía comparada de la Epidermis foliar
abaxial de *Commelina coelestis* Willd.
(Commelinaceae) procesada mediante nueve
distintas técnicas histológicas
55 p
2007



PENSAMIENTO

MENTALIZA TU META Y LA MATERIALIZARÁS

Magdalena Mercado Escutia

**“Hay un millón de batallas que ganar,
un millón de millas que recorrer,
un millón de fronteras que cruzar,
no dejes que nadie te enseñe el camino que has de seguir,
no permitas que nadie alce barreras ante tus ojos,
levántate por la mañana y camina con los ojos bien abiertos,
olvida las frases hechas por los necios,
no hay nada dicho,
mientras tengas pies para andar,
habrá montañas que escalar.”**

Bob Dylan

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su creación, y permitirnos conocer su obra.

A mi hermana “ Bety “ por sus consejos, y no dejarme caer en los momentos más difíciles en mi vida.

A mi amiga Blanca Ivette por su cariño , amistad y afinidad en cuanto a que el vuelo debe de ser siempre muy alto.

A mis amigos y amigas tanto reales como cibernéticos que me motivaron a seguir adelante.

A un hombre muy especial en mi vida.

A toda aquella persona que no creyó en mi superación.

A los espacios de la Facultad de Ciencias que permitieron la realización de mi trabajo, como el Laboratorio de Plantas II (Sr. Rosas).

Al laboratorio de Microcine, con la especial y fina atención de Ana Isabel Bieler, que me brindó un apoyo incondicional y sincero dentro y fuera de lo laboral, y además de dirigir también mi tesis, jamás dejó de creer en mí.

Agradezco en forma especial a mi asesora de tesis Dra. Aurora Zlotnik E. quien además de dirigir mi trabajo, me impulsó, motivó y confió en todo momento, laboral y personalmente en que se realizaría, uno de mis sueños profesionales, ¡MI TESIS!

Mil gracias, Aurora.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi mamá “Chave” por permitir mi existencia e inculcarme que el estudio y el prepararse día a día, es la vía para comprender y navegar en este gran océano que es la vida.

A mi hijos Nallely y Aldo por comprender que el tiempo que les robe no fue infructuoso.

Y gracias por inspirarme a seguir adelante. ¡Los amo!

A mi persona, porque he comprendido que a pesar de que el camino es pedregoso, se tiene la capacidad y la fuerza de seguir caminando, caminando a su paso, hasta llegar a la meta, no importando las caídas.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	p. 1
ANTECEDENTES.....	p. 3
OBJETIVOS.....	p. 22
METODOLOGÍA Y MÉTODOS.....	p. 23
RESULTADOS.....	p. 29
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	p. 47
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	p. 51

INTRODUCCIÓN

Aunque la Anatomía Vegetal es una disciplina biológica con una tradición de varios siglos, cotidianamente surge la necesidad de aportar información en este campo con el fin de mejorar los métodos y técnicas mediante los cuales contribuye a la resolución de problemas en ramas de la Botánica como la Ecofisiología y Taxonomía Vegetal.

La importancia del presente trabajo radica en la aplicación de distintas técnicas histológicas para la elaboración de laminillas semipermanentes de epidermis de *Commelina coelestis* Willd., así como la observación de dichas laminillas con diferentes sistemas de microscopía fotónica, lo que arroja información valiosa en cuanto a la utilidad de las distintas técnicas aplicadas y los sistemas de iluminación utilizados en lo referente a las estructuras celulares que se pueden observar en el material trabajado. Los resultados que aquí se presentan son un material de apoyo muy útil para todo aquel que quiera hacer investigación en el campo de la Anatomía Vegetal.

Para el presente estudio fue seleccionada *Commelina coelestis*, ya que es una especie vegetal que presenta una epidermis abaxial fácilmente disociable; esto facilita la aplicación de distintas técnicas histológicas para la obtención de laminillas semipermanentes que pueden ser observadas con diferentes sistemas de microscopía en un tiempo corto y con buenos resultados.

Por otro lado, dado que no existe mucha información sobre la epidermis abaxial de *Commelina coelestis*, este trabajo es una contribución al conocimiento de la estructura de esta especie que en México se encuentra ampliamente distribuida y que tiene utilidad medicinal (SEMARNAP: especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino¹, 2006).

¹ <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/CommelinaCoelestis.html>

Finalmente, se espera que el presente trabajo despierte el interés por realizar estudios anatómicos en especies vegetales de las que en este rubro haya escasa información, con el fin de ampliar los conocimientos de la flora de nuestro país, así como alentar la investigación e innovación en lo que se refiere a la aplicación de técnicas histológicas y sistemas de microscopía.

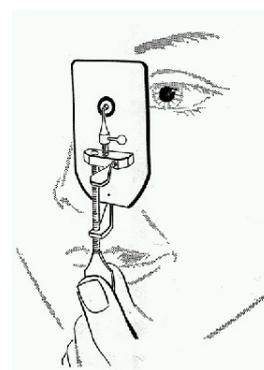
ANTECEDENTES

HISTORIA E IMPORTANCIA DE LA MICROSCOPIA FOTÓNICA

Es a finales del siglo XVII que se inventa el microscopio, instrumento de trabajo importante para diversas disciplinas científicas. Sus creadores fueron Hans y Zaccharias Janssen, quienes en Holanda, hace más de 300 años, lo utilizaron por primera vez en el año de 1590 (Timeline – History of Microscopes², 2006).

El término “microscopio” significa “que permite observar lo pequeño” (del griego *micro*—pequeño, y *skopeo*—observar) (Pequeño Larousse Ilustrado, 2000); esta denominación, utilizada por los miembros de una sociedad científica a la que pertenecía Galileo (la “Accademia dei Lincei”) (Historia del Microscopio³, 2006), se le dio cuando el microscopio tenía un solo paso de formación de imagen, pero ahora se aplica a todos los instrumentos amplificantes simples y compuestos. Cabe mencionar que en 1624, Fober llamaba al microscopio “Conspicillum, Perspicillum” (Arredondo y Martínez, 1978); los términos de esta denominación tienen un significado ambiguo, pero pueden interpretarse como “lugar desde donde mirar” (Vocabulary for Desiderius Erasmus⁴, 2007) y “mirar a la distancia” (The Perspective View⁵, 2007), respectivamente.

El impulsor de la microscopía fue el holandés Anton van Leeuwenhoek (1632-1723); este personaje elaboró microscopios con lentes convexas que él mismo pulía y logró hasta 275 aumentos (los mejores para su época (Timeline – History of Microscopes⁶, 2006)). Estos microscopios tenían una estructura muy rudimentaria que se componía de una lente



El microscopio de Leeuwenhoek

² <http://inventors.about.com/od/mstartinventions/a/microscopes.htm>

³ <http://personales.mundivia.es/mggalvez/micro2.htm>

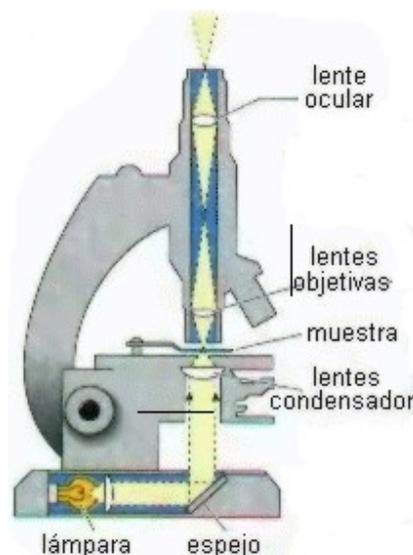
⁴ <http://www.stoa.org/hopper/vocab.jsp?doc=Stoa:text:2003.02.0006:colloquium=1:topic=3>

⁵ <http://www.museumonline.at/1997/schulen/bg10/english/perspect.htm>

⁶ <http://inventors.about.com/od/mstartinventions/a/microscopes.htm>

única engarzada entre dos placas de metal sujetas entre sí, atravesadas por una abertura. El objeto a observar era colocado en una aguja de metal, la cual mediante un tornillo podía girar de forma que se acercara o alejara del foco de la lente. Leeuwenhoek fue conocido por sus múltiples estudios, los que fueron apoyados por el uso del microscopio (Arredondo y Martínez, 1978).

A través del tiempo se han desarrollado muchas mejoras en la construcción de microscopios. Es, por ejemplo, en el siglo XVII que se introduce el uso de más de una lente, surgiendo el llamado “microscopio compuesto” (Vision Engineering: Microscope History, Science Technology⁷, 2006), y a partir de entonces se suceden distintos tipos de contribuciones para mejorar este instrumento de modo que, en el momento actual, el microscopio es y seguirá siendo de gran importancia para el avance de la ciencia, ya que la evolución de sus diferentes componentes y



Microscopio fotónico compuesto

funciones hace que cada vez haya microscopios más precisos, que amplifican imágenes que, de otro modo, difícilmente serían vistas por el ojo humano.

En el caso de la Botánica, los estudios de la estructura interna de las plantas han alcanzado su máxima expresión gracias al microscopio, habiéndose convertido este instrumento en parte esencial de los estudios en Anatomía Vegetal. La implementación de diferentes sistemas de microscopía, para dar una imagen con mayor y mejor resolución y aportar resultados más precisos, ha sido, en este contexto, sumamente valiosa. No obstante, con el advenimiento de la microscopía electrónica (tanto de transmisión como de barrido) y, más recientemente, de la microscopía confocal, se implementan nuevas técnicas e instrumentos para poder obtener mayor información del sujeto en estudio. Esto,

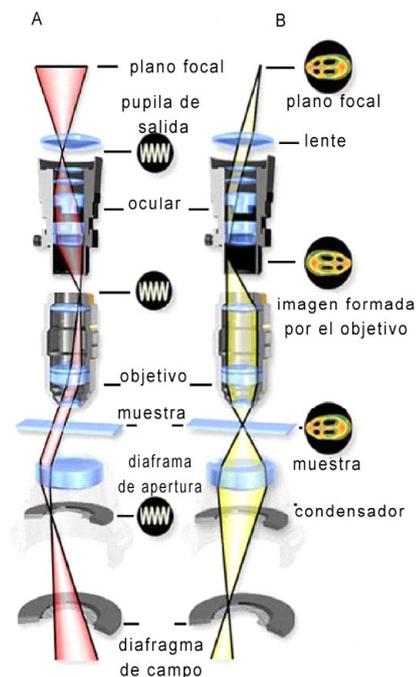
⁷ http://www.visioneng.com/technology/microscope_history.htm

sin embargo, en nada afecta el potencial de la microscopía fotónica y más aún con el registro y procesamiento digital de imágenes.

SISTEMAS ÓPTICOS DE MICROSCOPIA FOTÓNICA

Uno de los aspectos más críticos de la microscopía fotónica es el de asegurar que la muestra se encuentre iluminada homogéneamente con el fin de obtener imágenes con el máximo contraste y resolución; en este contexto, la técnica de iluminación Köhler introducida por August Köhler en 1893 es el método que aporta la óptima iluminación de la muestra, y es por ello que se le recomienda ampliamente, ya que un microscopio muy sofisticado y bien equipado puede arrojar imágenes de bajo contraste y resolución, si no se realizan los ajustes para una correcta iluminación (Optical Microscope Primer: Anatomy of the Microscope⁸, 2006).

La Iluminación según Köhler establece por un lado, la alineación del sistema óptico, mecánico y el de iluminación sobre el eje óptico del microscopio y por otro, la proyección del filamento de la lámpara hasta llegar a nivel de la muestra, con el correspondiente ajuste de la apertura numérica del objetivo; este tipo de iluminación es fundamental para la adecuada aplicación de los diferentes sistemas ópticos de microscopía fotónica (Nikon Introduction to Microscopes⁹, 2006; Science, Optics & You¹⁰, 2006).



Iluminación Köhler
A.- marcha de rayos iluminadores y
B.- marcha de rayos de formación de imagen

⁸ <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/illuminationhome.html>

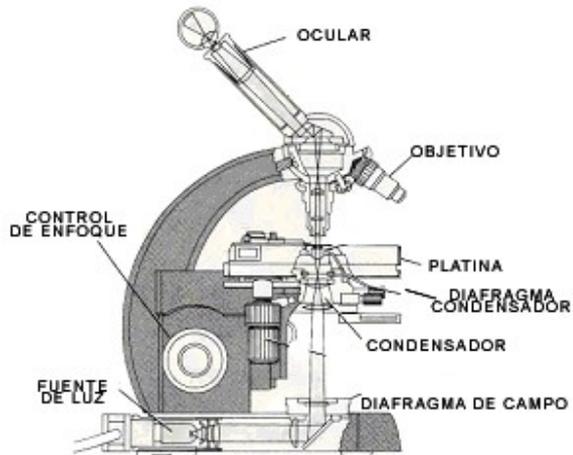
⁹ <http://www.coolscope.com/eng/tech/1-0-4.aspx>

¹⁰ <http://micro.magnet.fsu.edu/optics/olympusmicd/anatomy/index.html>

Las características particulares de los sistemas ópticos de microscopía fotónica aplicados en este trabajo es lo que se describe a continuación.

Microscopía de campo claro

Es el sistema óptico más usado desde su invención (hace cerca de 300 años) para observar material fijado y teñido. (D'Ambrogio,1986); las imágenes producidas en campo claro se ven contrastadas contra un fondo blanco (Optical Microscope Primer: Anatomy of the Microscope¹¹, 2006).



Microscopio de campo claro

En la actualidad el uso del microscopio de campo claro suele estar limitado a observar material procesado con colorantes que aumentan el contraste entre las partes de la muestra y el medio que le rodea; esto tiene la desventaja de que el material debe ser teñido (Arredondo y Martínez,1978; D'Ambrogio,1986).

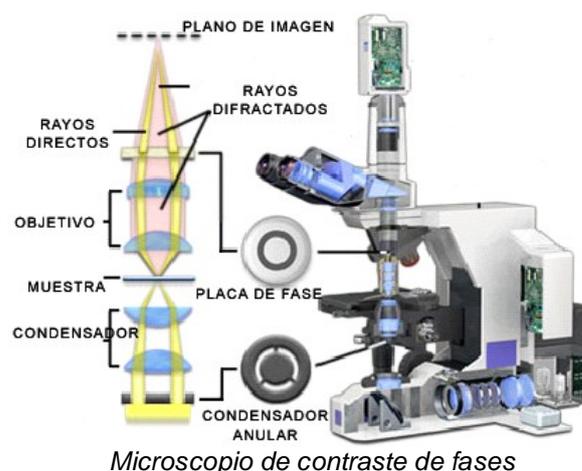
Este sistema debe su nombre a la imagen que aporta, en la que, como ya se señalaba, el objeto resalta sobre un fondo blanco brillante. En este sistema de iluminación la energía luminosa es modulada mediante reflexiones, dispersiones y refracciones para proporcionar una imagen ampliada de un objeto (Arredondo y Martínez, 1978).

¹¹ <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/brightfieldgallery/index.html>

Microscopía de contraste de fases

La microscopía de contraste de fases, descrita en 1934 por el físico holandés Fritz Zernike, es un sistema óptico que permite la observación de detalles en modelos transparentes, en los que las variaciones locales del índice de refracción son muy pequeñas, como en el caso de células vivas, microorganismos, cortes delgados de tejidos y partículas subcelulares (como núcleos y otros organelos) (Nikon MicroscopyU: Phase Contrast Microscopy¹², 2006). Una de sus mayores ventajas es que células vivas pueden ser examinadas en su estadio natural sin ser fijadas y teñidas; por ejemplo, se pueden observar muestras cultivadas, cuyo crecimiento y división mitótica puede seguirse, de ahí su amplia aplicación en Biología y Medicina (Hipertextos del Área de la Biología¹³, 2006; Nikon Introduction to Microscopes¹⁴, 2006).

Este tipo de microscopía está basado en la teoría de Abbe e involucra un proceso de desfasamiento y absorción de los rayos directos en el curso de la marcha de los rayos luminosos por medio de una placa de fase localizada en el plano posterior de los objetivos (Bennet, *et al.*, 1951).



Si bien esta técnica de microscopía revela detalles de los objetos que poseen pequeñas diferencias en la densidad óptica entre sus partes, o bien con respecto al medio que los rodea, tiene la desventaja de que puede provocar confusión de estructuras por generar un halo brillante (Arredondo y Martínez, 1978), fenómeno conocido como “efecto del halo” (Optical Microscopy

¹² <http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasehome.html>

¹³ <http://www.biologia.edu.ar/microscopia/microscopia1.htm>

¹⁴ <http://www.coolscope.com/eng/tech/1-0-4.aspx>

Primer: Specialized Techniques¹⁵, 2006). Es por ello que es necesario entrenarse en la correcta interpretación de las imágenes en contraste de fases.

Microscopía de luz polarizada

La microscopía de luz polarizada es un sistema óptico utilizado para el análisis cuantitativo de los patrones cristalinos de las muestras con actividad óptica, es decir, material con la capacidad de desviar el ángulo de la luz plano polarizada (que vibra en un solo plano). Por tanto, esta microscopía ayuda a distinguir entre materiales isotrópicos (que presentan exactamente las mismas propiedades en todas las direcciones) y anisotrópicos (que tienen propiedades distintas en cada dirección o “propiedades direccionales”), ya que explota las propiedades ópticas de la anisotropía para revelar información detallada acerca de la estructura y composición de los materiales, lo que resulta invaluable para su identificación y diagnóstico (Nikon MicroscopyU: Polarized Light Microscopy¹⁶, 2006).

Los materiales anisotrópicos tienen ejes cristalográficamente distintos que interaccionan con la luz de una manera que depende de la orientación de la matriz cristalina con respecto a la luz incidente. Cuando la luz entra a un eje no equivalente de un material anisotrópico, es refractada en dos rayos cada uno polarizado con la dirección de vibración orientada en ángulo recto una con respecto a la otra, y cada uno viajando a diferente velocidad. Este es el fenómeno conocido como “birrefringencia” que es visto en mayor o menor grado en los materiales anisotrópicos (Olympus Microscopy Resource Center: Polarized Light Microscopy¹⁷, 2006).

Es así como las aplicaciones más conocidas de la microscopía de la luz polarizada son las geológicas, aunque se le puede utilizar tanta cualitativa como

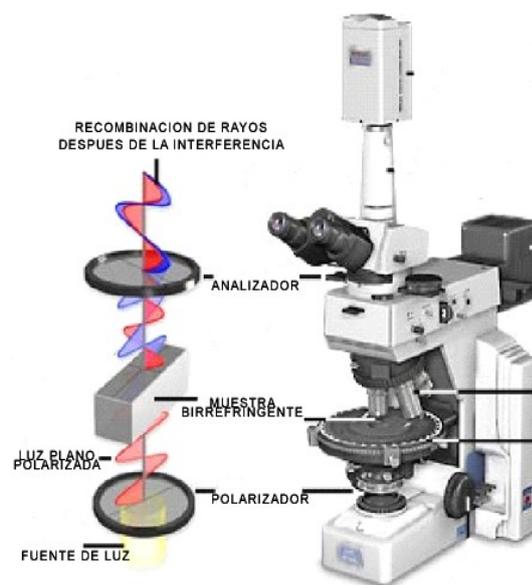
¹⁵ <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/phasecontrast/phaseindex.html>

¹⁶ <http://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedintro.html>

¹⁷ <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/polarized/polarizedhome.html>

cuantitativamente en la ciencia de materiales, química, biología, metalurgia y medicina (Nikon MicroscopyU: Polarized Light Microscopy¹⁸, 2006). Como ejemplos de materiales ópticamente activos tenemos: cristales de toda clase, almidón, cutículas de hojas de bulbo, fibras naturales de algodón, lana, seda, lino, cáñamo, pelos de animales, fibras sintéticas, escamas de pescados, secciones finas de cuernos, pezuñas, garras y uñas, huesos descalcificados, fibras musculares y algunos aceites y grasas (Casartelli, 1974).

El sistema de iluminación del microscopio de luz polarizada utiliza dos filtros polarizadores, uno antes de la muestra y otro colocado entre objetivo y ocular; de manera que al cruzarlos a 90°, se logra la extinción de la luz, de tal forma que al colocar la muestra entre ambos filtros, se obtiene una imagen con una “tinción óptica” con patrones característicos (Olympus Microscopy Resource Center: Polarized Light Microscopy¹⁹, 2006).



Microscopio de luz polarizada

Microscopía de contraste diferencial de interferencia (Nomarski)

El contraste diferencial de interferencia (CDI) es un sistema óptico ideal para la detección de superficies con relieve permitiendo disecciones ópticas de la muestra sin pérdida de resolución. Es un sistema de interferencia que hace posible la visibilidad de modelos transparentes en los que las variaciones del índice de refracción son muy pequeñas (Arnold, *et al.*, 1974; Olympus Microscopy Resource Center: Differential Interference Contrast²⁰, 2006).

¹⁸ <http://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedintro.html>

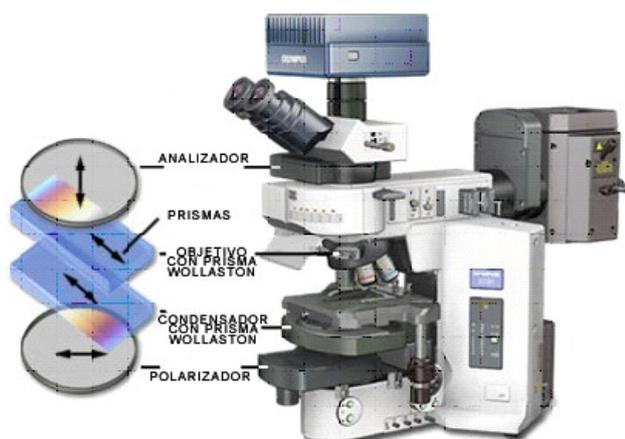
¹⁹ <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/polarized/polmicroalignment.html>

²⁰ <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dichome.html>

El sistema de CDI fue desarrollado a mediados de la década de los cincuenta, cuando el investigador francés Georges Nomarski modificó el prisma de Wollaston utilizado para detectar gradientes ópticos de las muestras, para convertir dichos gradientes en diferencias de intensidad. De tal suerte, especímenes vivos o teñidos que en iluminación de campo claro aportaban imágenes con poca información, se hacían claramente visibles por medios ópticos y no químicos (Davidson y Abramowitz, 1999).

El dispositivo del contraste diferencial de interferencia se basa en el principio de polarización y de la birrefringencia, con lo cual los objetos, sin haber sido coloreados, se exhiben con una gran riqueza de contraste. De tal manera que la luz procedente de la fuente de iluminación, primero se polariza linealmente para alcanzar el prisma de Wollaston donde se provoca la separación angular de los rayos. Estos rayos atraviesan la muestra y el objetivo del microscopio para converger en el plano posterior del objetivo donde se vuelven a unificar por efecto del segundo prisma de Wollaston. Después de esto, ocurre la interferencia correspondiente para dar las determinadas longitudes de onda en la imagen resultante (color de interferencia) (Davidson y Abramowitz, 1999; Meier, 2004). El resultado son imágenes con alta resolución, colores brillantes y un efecto de tridimensionalidad (Arnold, *et al.*, 1974; Meier, 2004).

El sistema de CDI puede ser considerado como una técnica complementaria al contraste de fases, ya que ambas técnicas son capaces de producir imágenes de alto contraste de especímenes biológicos transparentes que de ordinario no afectan la amplitud de la luz visible que los atraviesa. La diferencia fundamental entre el sistema CDI y el contraste de fases



Microscopio de contraste diferencial de interferencia

es la base óptica sobre la que se forman las imágenes (Olympus Microscopy Resource Center: Differential Interference Contrast²¹, 2006).

USOS E IMPORTANCIA DE LOS COLORANTES BIOLÓGICOS

Como ya se ha explicado en las secciones anteriores, un mundo con formas de vida diversas y fascinantes, invisibles al ojo humano, se hace evidente con la ayuda del microscopio como instrumento esencial; los colorantes biológicos, sin embargo, son de gran importancia para lograr una adecuada observación del mundo microscópico, ya que muchos organismos son prácticamente incoloros y sería muy difícil verlos sin la ayuda de estas sustancias especializadas (Biological Stain Commission²², 2006).

En el caso de los tejidos, los colorantes biológicos se utilizan para aumentar el contraste visual entre sus elementos (History of the Biological Stain Commission²³, 2006). Si bien esto entraña una interacción química ya sea covalente o no covalente entre el colorante y ciertos componentes celulares, el proceso de teñir tejidos completos o seccionados tiene tanto de arte como de

²¹ <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dichome.html>

²² http://www.science-education.org/classroom_activities/chlorine_compound/methylene_blue.html

²³ http://www.biostains.org/new_page_3.htm

ciencia, ya que la tinción es el resultado de un sinergismo entre el colorante que se adiciona, frecuentemente una sal metálica que se utiliza como mordiente (sustancia que mejora las propiedades de tinción del colorante), el tiempo de tinción, la “diferenciación” del colorante por componentes adicionales, la magnitud de la decoloración (cuando se aplica), la temperatura a la que se tiñe y, por supuesto, la naturaleza del tejido (Ruzin, 1999).

Históricamente, los colorantes biológicos han sido agrupados en dos grandes clases: la de los colorantes naturales y la de los colorantes artificiales o sintéticos (Lillie, 1977). Hoy día, no obstante, los colorantes suelen ser agrupados en diferentes clases dependiendo de su especificidad y su estructura química (Ruzin, 1999). En lo que a las tinciones para tejidos vegetales se refiere, suele hacerse la distinción un tanto burda entre los colorantes para tejidos en general y aquellos para tejidos leñosos; esta distinción, sin embargo, no es para nada absoluta, siendo comparable a la distinción entre colorantes para tejidos en general y aquellos para el tejido conectivo en el ámbito zoológico (Lillie, 1977). Si bien un colorante usado con mucha frecuencia para teñir tejidos vegetales es la hematoxilina, tanto para tejidos en general como para tejidos leñosos, igualmente difundido es el uso de la safranina en combinación con un contracolorante azul o verde (Lillie, 1977), pero esto no obsta para que la lista de los colorantes más comúnmente utilizados en microtécnica vegetal sea sumamente amplia, tal y como se puede evidenciar en la siguiente tabla, basada en Ruzin (1999):

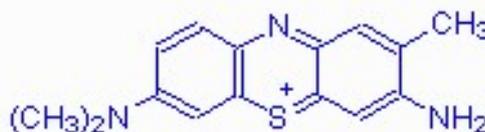
Colorantes de uso común en microtécnica vegetal

nombre	uso
Azul anilina WS	Contratinción de la safranina O; calosa
Azul de metileno	Contratinción de los colorantes Azur
Azul de toluidina O	Colorante metacromático
Azur II, A, B	Usado frecuentemente como contratinción con azul de metileno
Carmín	Colorante citogenético clásico
Eritrosina B	Contratinción del violeta cristal
Fucsina ácida	Celulosa, esporas
Fucsina básica	Tinción nuclear de Feulgen; también mucina, bacterias y tejido lignificado
Hematoxilina	Excelente colorante para ácidos nucleicos
Hemisulfato de berberina	Suberina
Naranja G	Contratinción general, muy útil con hematoxilina
Negro de clorazol E	Colorante policromático general para tejidos infiltrados en parafina
Rojo burdeos	Contratinción citoplasmática de la hematoxilina
Safranina O	Lignina, cutina, suberina, quitina, cromosomas, nucleolos
Sudán IV	Colorante para lípidos: resinas, ceras, cutícula
Verde fijo FCF	Contratinción de la safranina O
Violeta cristal	Contratinción para el verde fijo FCF o eritrosina
Yodo-yoduro de potasio	Colorante clásico para almidón

A continuación se detallan las principales características de los colorantes utilizados en este trabajo.

Azul de toluidina O

Si bien su nombre clásico es azul de toluidina, también se le conoce como azul de metileno T50 o T extra (Lillie, 1977), y es un colorante sumamente útil ya que,



Fórmula del azul de toluidina O

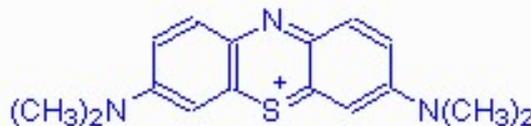
entre los colorantes básicos, es uno de los mejor conocidos en relación a su característica de metacromasia. La metacromasia es la variabilidad en color de un colorante que depende de la naturaleza del sustrato por el que es adsorbido, es decir, es un tipo de tinción en la que un mismo colorante da a diferentes tejidos distintos tonos de coloración (MerckSource²⁴, 2006).

La característica de metacromasia del azul de toluidina O depende de factores como el pH de la solución (O'Brien y McCully, 1981), así como de otras condicionantes como, por ejemplo, la temperatura (Kelly y Chang, 1969) y la concentración (se considera que la concentración mínima para mostrar metacromasia es de 0.5% (O'Brien y McCully, 1981)). Es por ello que comúnmente este colorante se comporta de manera ortocromática (ausencia de cambio de color del colorante ya sea en solución o cuando se une a los tejidos), de modo que la mayor parte de los tejidos se observan azulosos: la tinción puede ser intensa pero ortocromática (Bergeron y Singer, 1958).

²⁴http://www.mercksource.com/pp/us/cns/cns_hl_dorlands.jspzQzpgzEzzSzppdocszSzuszSzcommonzSzdorlandszSzdorlandzSzdmd_m_11zPzhtm

Azul de metileno

El azul de metileno es uno de los colorantes de uso más común (StainsFile²⁵, 2006), ya que se le utiliza ampliamente en procedimientos bacteriológicos e histológicos (Lillie, 1977).

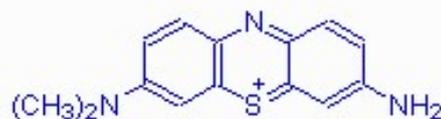


Fórmula del azul de metileno

Típicamente se prepara al azul de metileno en soluciones 0.5 a 1% ya sea en agua o alcohol, que se alcalinizan al agregar unas gotas de NaOH o KOH (CRScientific²⁶, 2006). Es muy diluido (1 parte por 100,000) que funciona como colorante vital (que se puede aplicar a células y tejidos vivos sin matarlos), esto especialmente para el estudio de protozoarios (Howey²⁷, 2000).

Azur A

El azur A se forma a partir de la oxidación del azul de metileno (StainsFile²⁸, 2006) y, desde el punto de vista espectrofotométrico, muestra gran similitud con el azul de toluidina (Lillie, 1977).



Fórmula del azur A

Es por ello que algunas fuentes señalan que el azur A exhibe una ortocromasia azul y una metacromasia rojo-violeta; es necesario, sin embargo, oxidar primero el tejido a base de tratamiento con permanganato de potasio para lograr que el colorante manifieste su propiedad de metacromasia (Azure A for Mast Cells Staining Protocol²⁹, 2005).

²⁵ <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/52015.htm>

²⁶ <http://www.crscientific.com/microscope-stain.html>

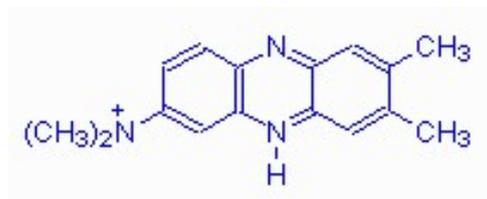
²⁷ <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artfeb00/rhvital.html>

²⁸ <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/52005.htm>

²⁹ http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/azure-a_ellis.htm

Rojo neutro

Otro colorante sumamente utilizado es el rojo neutro, que es tanto un colorante como un indicador ya que su color cambia de rojo a amarillo en un rango de pH de 6.8 a 8.0 (StainsFile³⁰, 2006).

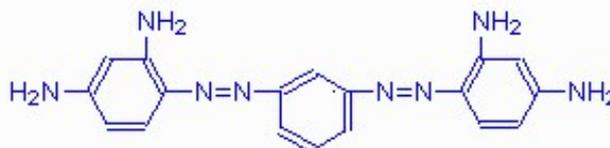


Fórmula del rojo neutro

Es de gran valor para lograr coloración vital, especialmente en protozoarios y núcleos de células vivas (Lillie, 1977).

Pardo de Bismarck

Aunque en el pasado su uso fue mayor de lo que es actualmente, el pardo de Bismarck



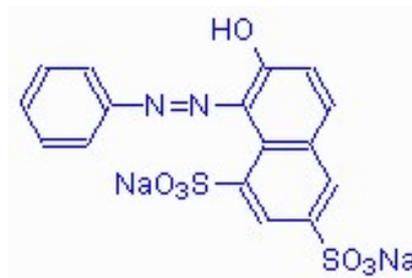
Fórmula del pardo de Bismarck

es un importante colorante metacromático usado para teñir mucinas ácidas; forma parte también de las soluciones para teñir las laminillas de estudios de Papanicolau (StainFiles³¹, 2006).

En plantas se le ha utilizado para teñir paredes celulares y contrastar a la hematoxilina (Lillie, 1977).

Naranja G

El naranja G es un colorante fuertemente ácido que es considerado una de las herramientas más valiosas a nivel de trabajo histológico para teñir



Fórmula del naranja G

³⁰ <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/nuclei/neutred.htm>

³¹ <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/21000.htm>

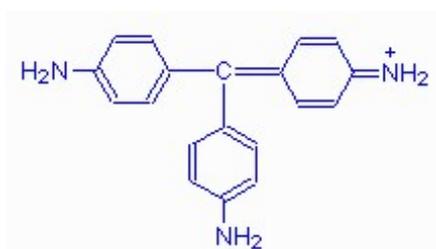
citoplasma; para ello lo han utilizado tanto zoólogos como botánicos, generalmente en combinación con colorantes que tiñen núcleos, como el violeta de genciana (Lillie, 1977).

Es parte de la tinción OG6 para Papanicolau (StainsFile³², 2006) y, aunque se le suele manejar en soluciones alcohólicas, también se utilizan las soluciones acuosas saturadas (Histopathology Recipe Formulary³³, 2006).

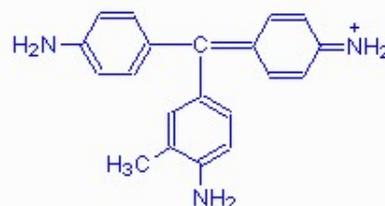
Fucsina básica

La fucsina básica es la mezcla de tres colorantes relacionados desde el punto de vista químico (pararosanilina, rosanilina y magenta II). Las proporciones en la mezcla son variables y es por ello que los distintos lotes del colorante funcionan diferente por lo que si bien un lote puede dar excelentes resultados para una cierta técnica, uno distinto puede ser totalmente inadecuado (StainsFile³⁴, 2006).

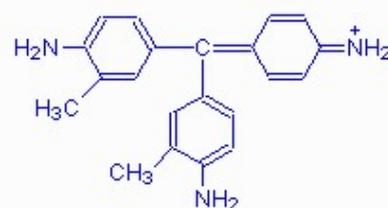
La fucsina ácida, no obstante, tiene muchos usos biológicos, ya que es uno de los colorantes nucleares más potentes; es el principal constituyente del reactivo de Schiff, frecuentemente utilizado para la detección de aldehídos así como de ácidos nucleicos en la reacción de Feulgen (Lillie, 1977).



Fórmula de la pararosanilina



Fórmula de la rosanilina



Fórmula del magenta II

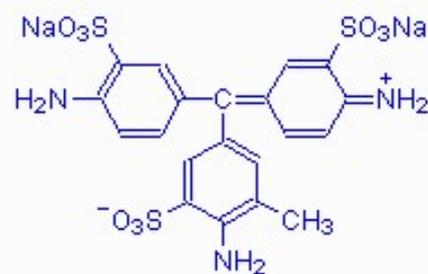
³² <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/16230.htm>

³³ http://www.hoslink.com/histo/histo_recipes.htm

³⁴ <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/basfuch.htm>

Fucsina ácida

La fucsina ácida es preparada a partir de homólogos de la fucsina básica a los que se les adicionan grupos sulfónicos. Es por ello que hay cuatro compuestos que se ajustan a la denominación de “fucsina ácida”, la cual a nivel comercial es una mezcla variable (StainsFile³⁵, 2006).



Fórmula de la fucsina ácida

La fucsina ácida es un colorante citoplasmático ampliamente utilizado que a nivel de histología vegetal tiñe paredes celulósicas (Lillie, 1977).

ESTUDIOS SOBRE EPIDERMIS EN COMELINÁCEAS

Commelinaceae es una familia de monocotiledóneas bien definida que comprende 41 géneros y cerca de 650 especies que se caracterizan por presentar una vaina foliar cerrada, una lámina foliar succulenta y flores trímeras con pétalos y sépalos distinguibles; estas plantas son principalmente de regiones tropicales y subtropicales, aunque algunas especies se extienden hasta zonas templadas, hallándose su mayor diversidad en África donde ocurre cerca del 40% de las especies (Evans, *et al.*, 2000).

Esta familia de monocotiledóneas, después de Poaceae y Cyperaceae, es la que tiene mayor número de malezas de cultivo; entre ellas, algunas especies de *Commelina* y *Tinantia* son hospederas de ácaros, royas y virus, como el *Potato Y potyvirus* que afecta a *Solanum tuberosum* (Luque y Estrada, 2005). Es por esto que se les ha dedicado atención considerable, pues distintos trabajos abordan el problema de su potencial invasivo y de su manejo como malezas (Batianoff y Butler, 2002; Burns, 2004; Kelly y Skipworth, 1984a y b; Standish, 2001, 2002).

³⁵ <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/42685.htm>

Además, el grupo ha despertado interés en otros aspectos. De manera reciente se les ha estudiado especialmente en lo que respecta a sus relaciones filogenéticas, de ahí que a nivel de cladismo se hable del “clado commelínido” (Chase, 2004; Rudall, *et al.*, 2005); en los análisis cladísticos se utilizan muy diversos tipos de caracteres, incluidos los anatómicos, como cristales y estomas (Evans, *et al.*, 2000).

En este contexto cabe señalar que la epidermis de las comelináceas ha sido objeto de diversos estudios y trabajos de investigación debido a la facilidad con que se le puede disociar y la amplia accesibilidad de las especies de esta familia. Por ejemplo, la fisiología estomática ha sido estudiada en *Commelina communis* (Weyers y Travis, 1981), y a *Tradescantia* se le utiliza como organismo modelo para el estudio de patrones estomáticos (Croxdale, 1998).

En cuanto a estudios sobre anatomía, el trabajo clásico de Tomlinson (1966), da cuenta de la importancia sistemática del estudio de los caracteres anatómicos de las Commelinaceae. Uno de los rubros tratados en dicho trabajo es el de los tipos de estomas en esta familia de monocotiledóneas, refiriéndose la presencia de estomas bordeados por dos células subsidiarias laterales en *Cuthbertia* y *Triceratella*, de cuatro células subsidiarias (dos laterales y dos terminales) en *Callisia*, *Zebrina*, *Tradescantia* y *Tinantia*, entre otros muchos géneros, y de seis células subsidiarias (cuatro laterales y dos terminales) en *Commelina* y algunos otros géneros.

Dado que a la fecha, tal como en su momento lo planteara Tomlinson, el estudio de la anatomía de las Commelinaceae sigue siendo muy incompleto, el presente trabajo se fijó como objetivo analizar la epidermis foliar de *Commelina coelestis* Willd. mediante el uso de distintas técnicas histológicas y de sistemas de iluminación al microscopio fotónica. Las características de esta especie son lo que se expone a continuación.

CARACTERÍSTICAS DE Commelina coelestis Willd.

Descripción de Commelina coelestis Willd.

(Tomada de Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2001, y PROCYMAF-SEMARNAP³⁶, 2000)

Planta perenne, erecta, robusta o delicada, glabra o más o menos pubescente, de 40 a 80 cm (1.5 m) de alto; raíces carnosas, alargadas fusiformes; tallos derechos, por lo general ramificados y escabrosos en la parte superior; hojas con vainas flojas, escariosas, a veces teñidas con morado, de 1.5 a 2.5 (5)cm de largo y 0.5 a 0.7 (2) cm de ancho, glabras, con frecuencia ciliadas en la parte superior, láminas ovado-lanceoladas a oblongo-lanceoladas (a lineares) de (4)8 a 20 cm de largo por 2.5 a 4 (5)cm de ancho, ápice agudo o acuminado, con frecuencia la base acorazonada o redondeada, envoltiva, haz escábrido, envés veloso o glabrado; pedúnculos escabrosos, delgados, de 1 a 6.5 (10)cm de largo, espátas (dobladas) de 2 a 4 (5)cm de largo y de 1 a 1.5 (2)cm de ancho, ápice agudo o acuminado, con frecuencia teñidas de morado, más o menos vellosas, con venas transversales conspicuas; sépalos de 5 a 7 mm de largo; pétalos iguales o subiguales, de color azul intenso (excepcionalmente blancos de ± 1.5 cm de largo por ± 2 cms de ancho; 3 estambres, 3 estaminodios, sus anteras amarillas en



Ilustración de Commelina coelestis en una publicación inglesa del siglo XIX

³⁶ <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/CommelinaCoelestis.html>

forma de H, cápsula bivalva, elipsoide, cortamente apiculada de 7 mm de largo; 4 semillas foveoladas piramidales de 2 a 3 (3.5 mm) de largo; conocida como “hierba de pollo”, “cañita”, “cielo azul”. Altitud de 2250-2750 msnm, en matorrales pastizales, bosques de encino y pino; frecuentemente en la vegetación secundaria, a veces como maleza ruderal o arvense; crece en estados como Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca; en la cuenca de México se le encuentra en Huehuetoca, Villa Nicolás Romero y Texcoco a Tlalpan, Milpa Alta y Amecameca. En medicina vernácula tiene fama como hemostático eficaz.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir las características principales de la epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis* Willd. estableciendo una comparación con la información que arroja el uso de diferentes sistemas de microscopía fotónica en material vegetal procesado con distintas técnicas histológicas para poner en evidencia la utilidad tanto de las técnicas histológicas como de los sistemas de microscopía fotónica aplicados.

OBJETIVOS PARTICULARES

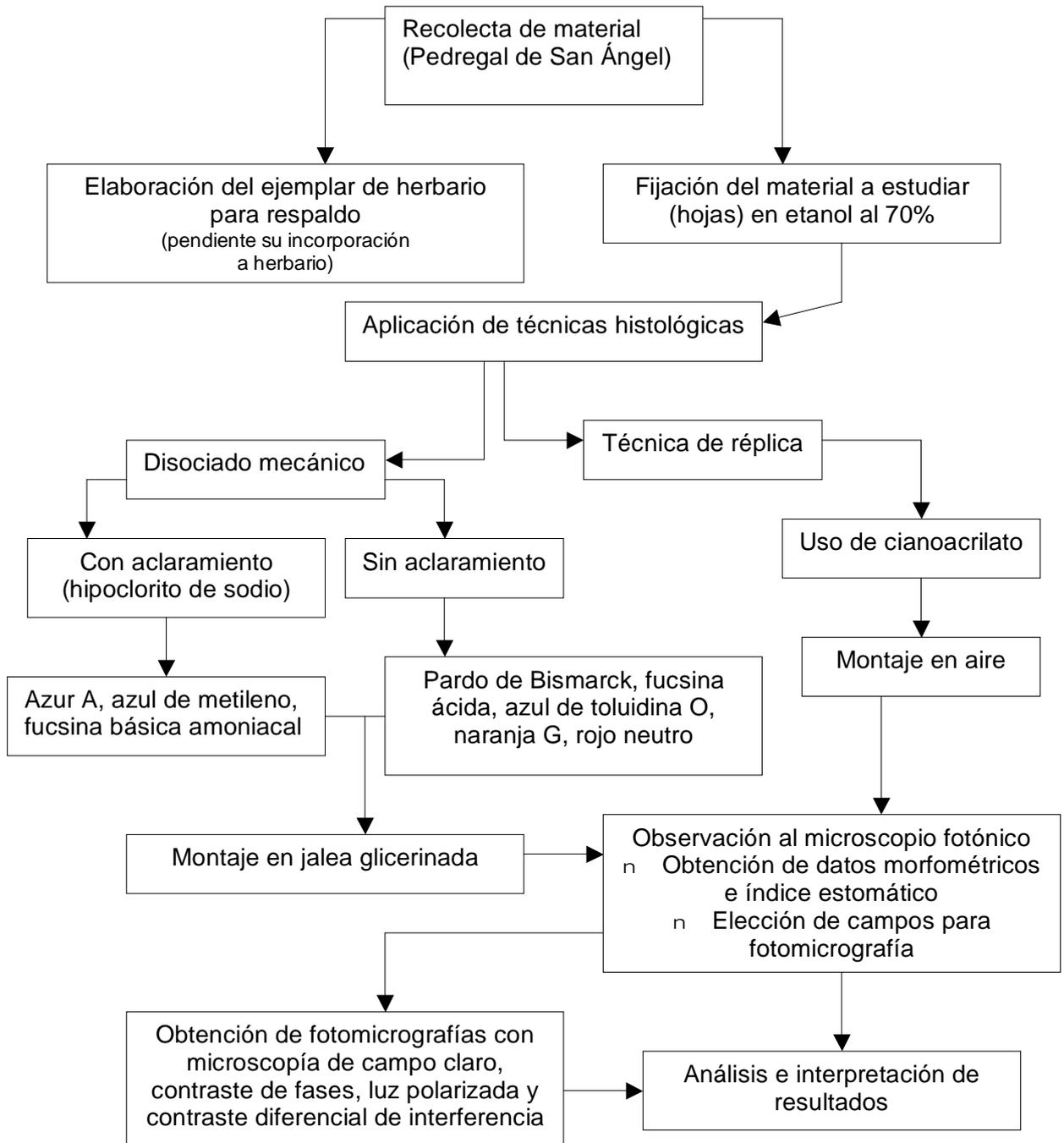
Aplicar diversas técnicas histológicas para la obtención de laminillas de la epidermis de *Commelina coelestis* Willd., que sean observadas mediante la aplicación de diferentes sistemas de microscopía fotónica.

Describir la epidermis foliar de *Commelina coelestis* Willd. incluyendo datos morfométricos de los estomas e índice estomático.

Obtener fotomicrografías de la epidermis foliar de *Commelina coelestis* Willd. de tal forma que pueda hacerse una comparación entre la información que se obtiene del uso de las distintas técnicas histológicas y los diferentes sistemas de microscopía, con la finalidad de poner en evidencia la utilidad de los mismos.

METODOLOGÍA Y MÉTODOS

METODOLOGÍA: DIAGRAMA DE FLUJO



MÉTODOS

De inicio, se realizó una recolecta de *Commelina coelestis* en los alrededores de la Facultad de Ciencias de la UNAM (reductos del Pedregal de San Ángel), en temporada de lluvias. El material se fijó en etanol al 70 % para su posterior estudio.

A continuación se describen las técnicas aplicadas en este trabajo para el estudio de la epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis*.

Disociado mecánico

Es una técnica sencilla, práctica, rápida y útil en el estudio de epidermis vegetal. Consiste en separar la epidermis del vegetal para aplicar posteriormente diferentes técnicas tanto de transparentación como de tinción (D´Ambrogio, 1986).

Mediante el uso de una navaja de rasurar y pinzas de relojero (de punta fina) se cortó y desprendió una porción muy pequeña de la epidermis abaxial de las hojas fijadas de *Commelina coelestis*. Esta epidermis fue colocada en un portaobjetos e inmediatamente se aplicaron las distintas técnicas histológicas, que básicamente consistieron en teñir con colorantes muy diluidos (0.5%), algunas veces con aclaramiento previo y otras sin él.

Técnicas de tinción con aclaramiento

Estas técnicas incluyeron el uso del Azur A y el azul de metileno disueltos en agua, y de la fucsina básica disuelta en agua y blanqueada a base de agregar amoniaco (fucsina básica amoniaco).

En ellas se colocó sobre la epidermis ya desprendida una gota de hipoclorito de sodio en dilución comercial durante unos cuantos minutos, hasta observar como se perdía el color verde de la clorofila.

Con papel absorbente se eliminaron los excedentes del agente aclarante, e inmediatamente después se aplicó una gota del colorante. La tinción se logró en un tiempo corto (1 a 2 minutos), tiempo en que se eliminaron los excedentes del colorante para proceder a montar la epidermis así teñida en jalea glicerinada.

El montaje en jalea glicerinada es sencillo y aporta laminillas semipermanentes que pueden llegar a ser de muy buena calidad; un detalle que hay que cuidar, sin embargo, es que al derretir la jalea esto se haga con cuidado y sin aplicar demasiado calor, con el fin de evitar la formación excesiva de burbujas de aire que son las que suelen entorpecer la observación del tejido.

Otro detalle importante es el de aplicar barniz de uñas transparente en todo el contorno del cubreobjetos, una vez que ha “enfriado” la preparación, para sellarla y evitar que el medio de montaje pierda humedad. Finalmente, hay que enfatizar la importancia del etiquetado; en este caso se especificó con claridad el tipo de colorante utilizado en la elaboración de cada laminilla.

Técnicas de tinción sin aclaramiento.

Sin aclaramiento previo se utilizaron los siguientes colorantes: pardo de Bismarck, fucsina ácida, azul de toluidina, rojo neutro y naranja G. En estos casos, no se transparentó la epidermis sino que se aplicó directamente una gota de colorante a la epidermis desprendida, dando un tiempo de tinción de 1 minuto.

Transcurrido este tiempo, se quitó el excedente del colorante con papel absorbente y se realizó el montaje del material en jalea glicerinada, realizándose el sellado y etiquetado de las laminillas una vez “frías”.

Técnica de réplica

En esta técnica sencilla se empleó un pegamento transparente y de secado rápido que es el cianoacrilato. Se colocó una gota del pegamento sobre el portaobjetos y sobre ella, por el lado abaxial, un pedacito cuadrado de hoja, presionando para favorecer que se formara una capa delgada del pegamento.

Se cuidó que el ejemplar estuviera bien embebido en el pegamento y que éste seicara completamente, para después, con ayuda de unas pinzas de relojero (de punta fina), desprender el pedacito de la hoja de un jalón cuidando que la impresión no se dañara.

Luego se colocó un cubreobjetos sobre la impresión y se selló el contorno del cubreobjetos con barniz de uñas transparente (montaje en aire) y se etiquetó la preparación.

Todas las preparaciones obtenidas con las diferentes técnicas antes descritas permitieron realizar la determinación de datos morfométricos e índice estómatico, así como la selección de campos para la obtención de fotomicrografías con distintos sistemas de microscopía.

Descripción de la aplicación de la microscopía comparada

Se utilizó un microscopio fotónico marca Olympus, modelo Provis AX70, que permite la aplicación de sistemas de iluminación de campo claro, contraste de fases, luz polarizada y contraste diferencial de interferencia (Nomarski). Todos estos sistemas de iluminación se aplicaron a las laminillas obtenidas a través de las técnicas descritas con antelación, de modo tal que se obtuvieron cuatro tipos distintos de fotomicrografías para nueve distintas técnicas de preparación de la epidermis.

Cabe señalar que, aunque se realizaron varias laminillas de cada una de las técnicas, se eligieron sólo los mejores campos para la toma de las fotomicrografías.

Determinación del índice estomático

Para calcular el índice estomático de *Commelina coelestis*, se eligieron al azar fotomicrografías de cinco áreas diferentes de epidermis foliar abaxial.

Sobre cada fotomicrografía elegida se realizó un conteo de células estomáticas y células epidérmicas (no estomáticas). Una vez obtenido el dato de células de cada tipo, se calculó el índice estomático de acuerdo a la fórmula de Salisbury ,1928 (Willmer, 1983):

$$\text{I.E.} = (\text{N. E.} / \text{N.E.} + \text{N.C.E.}) \times 100$$

donde:

I.E. = índice estomático

N.E. = # de células estomáticas por campo

N.C.E. = # de células epidérmicas no estomáticas por campo

De este modo, para cada fotomicrografía se obtuvo un valor de índice estomático por lo que se procedió entonces a obtener un valor promedio que es el que se presenta en la sección de resultados.

Obtención de datos morfométricos

En un campo de 40x de un microscopio fotónico, y con ayuda de un micrómetro ocular, se tomaron medidas tanto de largo como de ancho de 10 estomas en varias preparaciones tomadas al azar (para un total de 50 estomas).

Las medidas del largo de los estomas correspondieron a su eje mayor, mientras que las medidas de ancho a su eje menor. Estas medidas fueron multiplicadas por el factor de calibración del objetivo 40x ($0.38 \mu\text{m}/\text{unidades oculares}$) para transformar los resultados obtenidos a micrómetros. Con los datos de largo y ancho obtenidos se obtuvieron valores promedio que son los que se presentan en la sección de resultados.

RESULTADOS

Los datos obtenidos en el presente trabajo son de tipo cualitativo y cuantitativo. A continuación se presentan en dos grandes apartados; el primero incluye la descripción general de la epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis* Willd. y el segundo los resultados de aplicar la microscopía fotónica comparada a las laminillas preparadas mediante las distintas técnicas expuestas en la sección de “Métodos”.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA EPIDERMIS FOLIAR ABAXIAL DE Commelina coelestis Willd.

La epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis* se caracteriza por la presencia de células epidérmicas ordinarias, estomas y tricomas (figura 1). Las células epidérmicas ordinarias son de forma rectangular y contorno regular (carecen de paredes festonadas). Los estomas son de tipo hexacítico (presencia

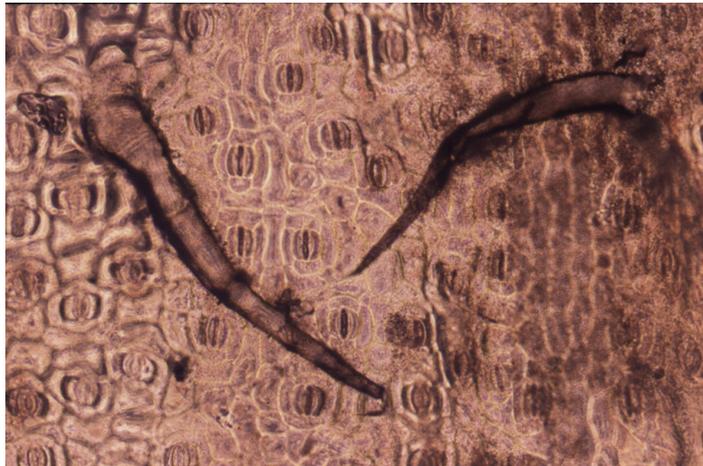


Figura 1. Epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis* (réplica de cianoacrilato): se observan células epidérmicas ordinarias, estomas hexacíticos y tricomas simples, pluricelulares y uniseriados.

de seis células acompañantes), su tamaño promedio es de 51.89 x 30.83 micrómetros, siendo el índice estomático promedio de 20.52. Este índice es considerado alto, indica una riqueza en el número de estomas, y su significado fisiológico es que la especie presenta una transpiración alta, lo que se asocia a que crece en hábitats húmedos o que, como *C. coelestis*, crece en temporada de lluvias. Los tricomas son de tipo simple, pluricelulares y uniseriados.

INFORMACIÓN OBTENIDA DE LA MICROSCOPIA FOTÓNICA COMPARADA

La microscopía fotónica comparada permitió obtener una diversidad de imágenes que son las que se presentan en las láminas 1 a 5 (incluidas al final de este apartado); en estas imágenes fue posible observar detalles de gran interés de la epidermis abaxial de *Commelina coelestis*, mismos que se describen a continuación.

Aspecto de núcleos y nucleolos

Una primera diferencia en relación a las distintas técnicas aplicadas se refiere al aspecto que en cada una de ellas tienen núcleos y nucleolos. Mientras que algunos colorantes no permiten evidenciar estos organelos, con algunos otros la observación de los mismos puede hacerse con mucha nitidez, a saber:

- n Azul de metileno (AM): no favorece la observación de núcleos en los cuatro sistemas de iluminación empleados.
- n Azul de toluidina O (AT): es un muy buen colorante para ver núcleos en todo el complejo estomático (células estomáticas y acompañantes) en los cuatro sistemas de iluminación, pero no se ven muy bien los nucleolos.
- n Azur A (AA): sólo favorece la observación de núcleos en células estomáticas en campo claro y contraste de fases, y nucleolos en campo claro.
- n Cianoacrilato (CIAN): con esta técnica no se pueden ver núcleos, ya que sólo se obtiene la huella de la epidermis.
- n Fucsina ácida (FA): se ven núcleos en células estomáticas con los cuatro sistemas de iluminación, y nucleolos en campo claro, contraste diferencial de interferencia y contraste de fases.
- n Fucsina básica amoniacal (FBA): se ven núcleos en células acompañantes en campo claro, contraste diferencial de interferencia y contraste de fases; a veces se insinúan los nucleolos, pero no son muy nítidos.

n Naranja G (NG). se ven núcleos en todo el complejo estomático con los sistemas de iluminación campo claro, contraste diferencial de interferencia, y contraste de fases; y nucleolos en campo claro y contraste de fases.

n Pardo de Bismarck (PB): se ven núcleos con los cuatro sistemas de iluminación; en campo claro y contraste diferencial de interferencia se ven en todo el complejo estomático, en contraste de fases además de núcleos se ven nucleolos, y con luz polarizada sólo se ven núcleos en células acompañantes.

n Rojo neutro (RN): se observan núcleos en los cuatro sistemas de iluminación, tanto en células estomáticas como acompañantes; y en contraste de fases se ven los nucleolos con bastante nitidez

Esta información se encuentra resumida en el siguiente cuadro:

CUADRO 1. ASPECTO DE NÚCLEOS Y NUCLEOLOS
(ver figura 2)

Escala de valor:

___ no se ven

+ se ven sólo en células estomáticas (ce) o células acompañantes (ca)

++ se ven en células estomáticas (ce) y células acompañantes (ca)

* se ve nucleolo

	<i>AM</i>	<i>AT</i>	<i>AA</i>	<i>CIAN</i>	<i>FA</i>	<i>FBA</i>	<i>NG</i>	<i>PB</i>	<i>RN</i>
CC	___	++	*+(ce)	___	*+(ce)	+(ca)	*++	++	++
LP	___	++	___	___	+(ce)	+(ca)	___	+(ca)	++
CDI	___	++	___	___	*+(ce)	+(ca)	++	++	++
CF	___	++	+(ce)	___	*+(ce)	+(ca)	*++	*++	*++

CC = campo claro

LP = luz polarizada

CDI = contraste diferencial de interferencia

CF = contraste de fases

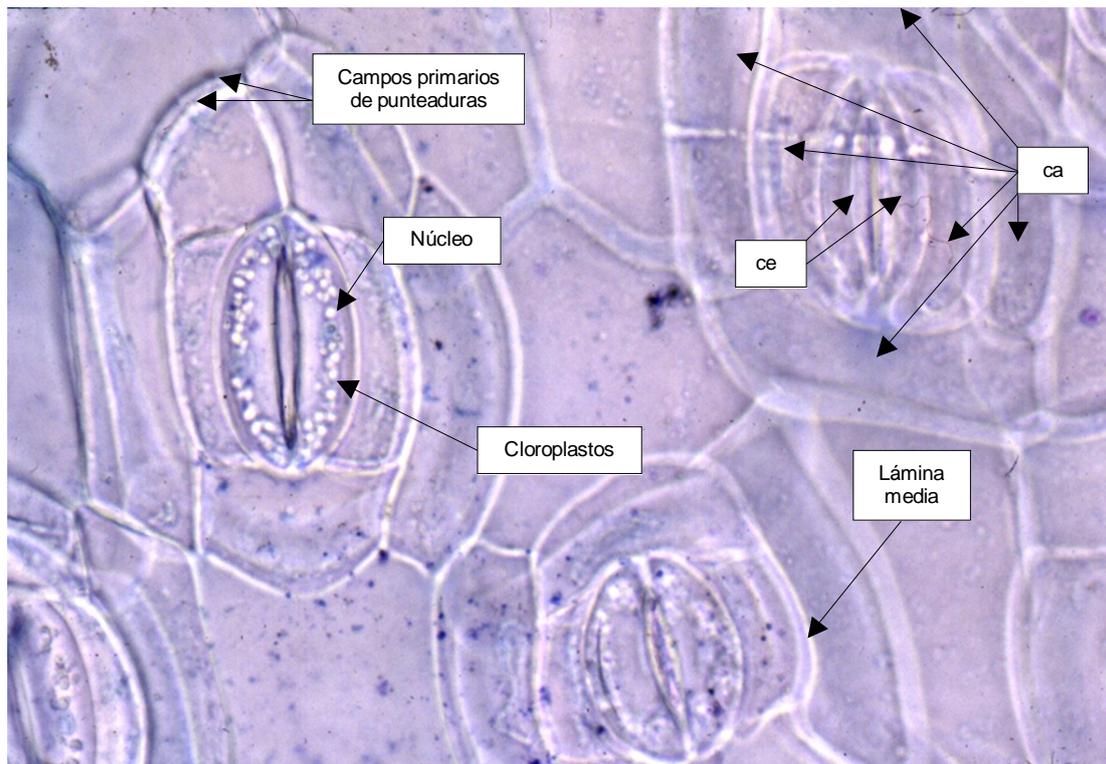


Figura 2. Detalle de estructuras en laminilla teñida con azul A y con iluminación de campo claro. ce = células estomáticas, ca = células acompañantes

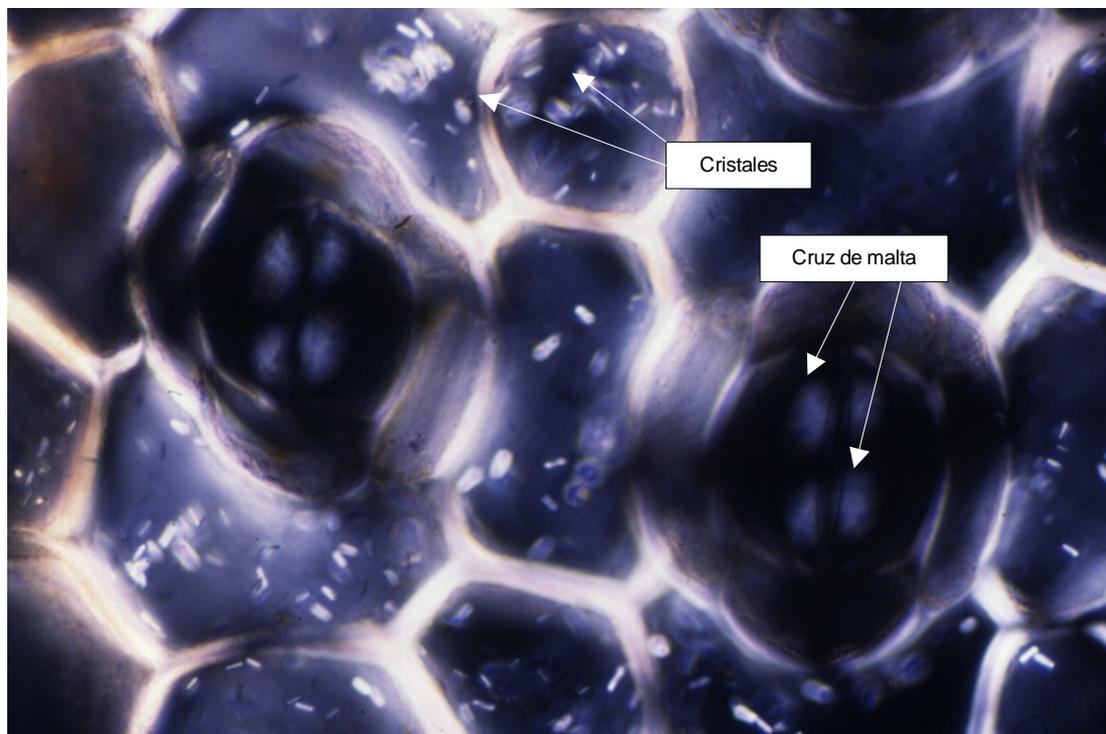


Figura 3. Detalle de estructuras en laminilla teñida con naranja G y con iluminación de luz polarizada.

Aspecto de cloroplastos

El modo en que se presentan los cloroplastos de las células estomáticas también varía de acuerdo a la combinación de técnicas y los sistemas de iluminación. De manera general, los cloroplastos pueden no distinguirse claramente, sino apreciarse como una masa informe donde no es posible discernir la individualidad de cada cloroplasto, o ser vistos con toda claridad como estructuras independientes, a saber:

n Azul de metileno (AM) se ven cloroplastos en los cuatro sistemas de iluminación; en campo claro se ven como entidades independientes, y en los otros tres sistemas de iluminación no.

n Azul de toluidina O (AT) se ven cloroplastos con los cuatro sistemas de iluminación; en campo claro y contraste diferencial de interferencia se ven como entidades independientes, y en luz polarizada y contraste de fases no.

n Azur A (AA) se ven cloroplastos con los cuatro sistemas de iluminación; en campo claro se ven perfectamente como entidades independientes y en los otros tres sistemas de iluminación no.

n Cianoacrilato (CIAN): con esta técnica no se pueden ver cloroplastos, ya que sólo se obtiene la huella de la epidermis.

n Fucsina ácida (FA) se ven cloroplastos como masa informe, no como entidades independientes, en los cuatro sistemas de iluminación.

n Fucsina básica amoniacal(FBA): no se ven cloroplastos.

n Naranja G (NG): se ven cloroplastos en campo claro como entidades independientes. No se ven con luz polarizada. En contraste diferencial de interferencia y contraste de fases se ven cloroplastos como masa informe, no como entidades independientes.

n Pardo de Bismarck (PB) en campo claro y contraste de fases se ven cloroplastos como entidades independientes, en luz polarizada no se ven, y en contraste diferencial de interferencia se ven como entidades no independientes (masa informe).

n Rojo neutro (RN) se ven cloroplastos como masa informe, no como entidades independientes, en los cuatro sistemas de iluminación.

Esta información se encuentra resumida en el siguiente cuadro:

CUADRO 2. ASPECTO DE LOS CLOROPLASTOS DE LAS CÉLULAS ESTOMÁTICAS
(ver figura 2)

Escala de valor:

— no se ven

+ se ven pero no como entidades independientes (masa informe)

++ se ven como entidades independientes

	<i>AM</i>	<i>AT</i>	<i>AA</i>	<i>CIAN</i>	<i>FA</i>	<i>FBA</i>	<i>NG</i>	<i>PB</i>	<i>RN</i>
CC	++	++	++	—	+	—	++	++	+
LP	+	+	+	—	+	—	—	—	+
CDI	+	++	+	—	+	—	+	+	+
CF	+	+	+	—	+	—	+	++	+

CC = campo claro

LP = luz polarizada

CDI = contraste diferencial de interferencia

CF = contraste de fases

Lámina media

La sustancia que cementa célula con célula, conocida como lámina media, puede apreciarse con algunas técnicas y sistemas de iluminación, mientras que con otras combinaciones no es evidente, a saber:

n Azul de metileno (AM): se ve la lámina media con los cuatro sistemas de iluminación.

n Azul de toluidina (AT) se ve la lámina media con los cuatro sistemas de iluminación.

n Azur A (AA) se ve la lámina media en campo claro, luz polarizada, contraste de fases, y no se ve en contraste diferencial de interferencia.

n Cianoacrilato (CIAN) no se ve la lámina media.

n Fucsina ácida(FA) se ve la lámina media con los cuatro sistemas de

iluminación.

n Fucsina básica amoniacal (FBA) se ve la lámina media con los cuatro sistemas de iluminación.

n Naranja G (NG) se ve la lámina media en los cuatro sistemas de iluminación.

n Pardo de Bismarck (PB) se ve la lámina media con los cuatro sistemas de iluminación .

n Rojo neutro (RN) se ve la lámina media con los cuatro sistemas de iluminación.

Esta información se encuentra resumida en el siguiente cuadro:

CUADRO 3. OBSERVACIÓN DE LA LÁMINA MEDIA.
(ver figura 2)

Escala de valor:

— no se ve

+ si se ve

	<i>AM</i>	<i>AT</i>	<i>AA</i>	<i>CIAN</i>	<i>FA</i>	<i>FBA</i>	<i>NG</i>	<i>PB</i>	<i>RN</i>
CC	+	+	+	—	+	+	+	+	+
LP	+	+	+	—	+	+	+	+	+
CDI	+	+	—	—	+	+	+	+	+
CF	+	+	+	—	+	+	+	+	+

CC = campo claro

LP = luz polarizada

CDI = contraste diferencial de interferencia

CF = contraste de fases

Aspecto de campos primarios de punteaduras

Los campos primarios de punteaduras, que son los ligeros adelgazamientos de la pared primaria en los cuales se desarrollan los plasmodesmos, varían en apariencia en las diferentes técnicas y sistemas de iluminación. En algunos casos no se les observa, mientras que en otros se observan con bastante claridad a nivel de campo claro; en este sentido, un hecho notable es que cuando en campo claro se les observa, tienden a enmascarse o a no verse en los otros sistemas de iluminación, a saber:

- n Azul de metileno (AM): se ven los campos primarios de punteaduras en algunas células sólo en campo claro; con los otros sistemas de iluminación no se ven.
- n Azul de toluidina O(AT): no se ven campos primarios de punteaduras, esto con los cuatro sistemas de iluminación.
- n Azur A (AA): se ven campos primarios de punteaduras en algunas células en campo claro; se enmascaran en contraste de fases y no se ven en contraste diferencial de interferencia y luz polarizada.
- n Cianoacrilato (CIAN): no se ven campos primarios de punteaduras, esto con los cuatro sistemas de iluminación.
- n Fucsina ácida (FA): se ven campos primarios de punteaduras en algunas células en campo claro; se enmascaran en contraste diferencial de interferencia y contraste de fases, y no se ven en luz polarizada.
- n Fucsina básica amoniacal (FBA): no se ven campos primarios de punteaduras, esto con los cuatro sistemas de iluminación.
- n Naranja G. (NG): no se ven campos primarios de punteaduras, esto con los cuatro sistemas de iluminación.
- n Pardo de Bismarck (PB): no se ven campos primarios de punteaduras, esto con los cuatro sistemas de iluminación.
- n Rojo neutro (RN): no se ven campos primarios de punteaduras, esto con los cuatro sistemas de iluminación.

Esta información se encuentra resumida en el siguiente cuadro:

CUADRO 4. ASPECTO DE LOS CAMPOS PRIMARIOS DE PUNTEADURAS
(ver figura 2)

Escala de valor:

— no se ven

+ se ven en algunas células

+/- se enmascaran

	<i>AM</i>	<i>AT</i>	<i>AA</i>	<i>CIAN</i>	<i>FA</i>	<i>FBA</i>	<i>NG</i>	<i>PB</i>	<i>RN</i>
CC	+	—	+	—	+	—	—	—	—
LP	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CDI	—	—	—	—	+/-	—	—	—	—
CF	—	—	+/-	—	+/-	—	—	—	—

CC = campo claro

LP = luz polarizada

CDI = contraste diferencial de interferencia

CF = contraste de fases

Cristales

Los pequeños cristales de oxalato de calcio presentes en las células epidérmicas ordinarias sólo son evidentes con las técnicas del naranja G y el pardo de Bismarck; en el primer caso se ven en todos los sistemas de iluminación y en el segundo sólo en los sistemas de luz polarizada y contraste de fases:

Esta información se encuentra resumida en el siguiente cuadro:

CUADRO 5. PRESENCIA DE CRISTALES EN CÉLULAS EPIDÉRMICAS ORDINARIAS (ver figura 3)

Escala de valor:

— no se ven

+ se ven

	<i>AM</i>	<i>AT</i>	<i>AA</i>	<i>CIAN</i>	<i>FA</i>	<i>FBA</i>	<i>NG</i>	<i>PB</i>	<i>RN</i>
CC	—	—	—	—	—	—	+	—	—
LP	—	—	—	—	—	—	+	+	—
CDI	—	—	—	—	—	—	+	—	—
CF	—	—	—	—	—	—	+	+	—

CC = campo claro

LP = luz polarizada

CDI = contraste diferencial de interferencia

CF = contraste de fases

Cruz de Malta en células estomáticas

La imagen de la cruz de Malta se asocia a la característica de birrefringencia de ciertos materiales y estructuras; en las células estomáticas parece obedecer a la orientación radial de las microfibrillas de celulosa en la pared (Willmer,1983). En los estomas de *C. coelestis* la presencia de Cruz de Malta se observa con todos los colorantes, sólo por la influencia de la luz polarizada.

Esta información se encuentra resumida en el siguiente cuadro:

CUADRO 6. CRUZ DE MALTA EN CÉLULAS ESTOMÁTICAS
(ver figura 3)

Escala de valor:

— no se ve

+ se ve

	<i>AM</i>	<i>AT</i>	<i>AA</i>	<i>CIAN</i>	<i>FA</i>	<i>FBA</i>	<i>NG</i>	<i>PB</i>	<i>RN</i>
CC	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LP	+	+	+	—	+	+	+	+	+
CDI	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CF	—	—	—	—	—	—	—	—	—

CC = campo claro

LP = luz polarizada

CDI = contraste diferencial de interferencia

CF = contraste de fases

Tricomas

Los tricomas de *C. coelestis* son relativamente grandes y por lo mismo tienden a romperse cuando se realiza el disociado mecánico de la epidermis abaxial. Es por ello que donde mejor se les aprecia es en las réplicas de cianoacrilato, ya que ahí se obtiene la imagen completa del tricoma y se puede observar su estructura. Los detalles de cómo se observan los tricomas en las laminillas de las diferentes técnicas se resumen en el siguiente cuadro:

CUADRO 7. ASPECTO DE TRICOMAS.
(ver figura 1)

Escala de valor:

— no se ven

+ se ve no muy definido

++se ve definido y con su base

	AM	AT	AA	CIAN	FA	FBA	NG	PB	RN
CC	—	—	—	++	+	—	—	—	—
LP	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CDI	—	—	—	++	+	—	—	—	—
CF	—	—	—	++	—	—	—	—	—

CC = campo claro

LP = luz polarizada

CDI = contraste diferencial de interferencia

CF = contraste de fases

Imagen con relieve

La aplicación del contraste diferencial de interferencia permitió observar imágenes con relieve para todas las técnicas aplicadas. Sólo en algunos casos (del rojo neutro, por ejemplo), se apreció relieve también con la aplicación de luz polarizada. Caso especial es el de las réplicas de cianoacrilato que, por contar con relieve propio, arrojan imágenes con relieve en todos los sistemas de iluminación que se le pudieron aplicar. Esta información se resume en el siguiente cuadro:

CUADRO 8. IMÁGENES CON RELIEVE
(ver láminas 1 a 5)

Escala de valor:

___no se ve

+ se ve todo en relieve

	<i>AM</i>	<i>AT</i>	<i>AA</i>	<i>CIAN</i>	<i>FA</i>	<i>FBA</i>	<i>NG</i>	<i>PB</i>	<i>RN</i>
CC	—	—	—	+	—	—	—	—	—
LP	—	—	—	—	—	—	—	—	+
CDI	+	+	+	+	+	+	—	+	—
CF	—	—	—	+	—	—	—	—	—

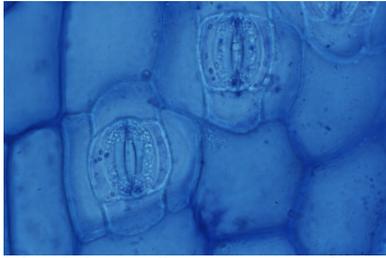
CC = campo claro

LP = luz polarizada

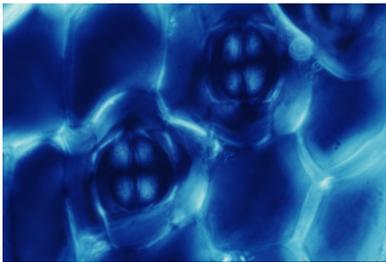
CDI = contraste diferencial de interferencia

CF = contraste de fases

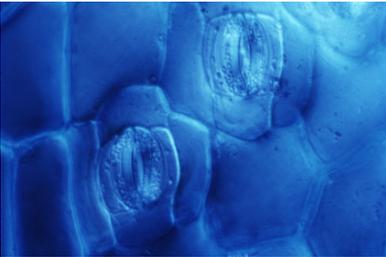
MICROSCOPIA FOTÓNICA COMPARADA: FOTOMICROGRAFIAS



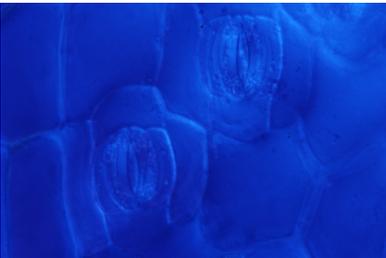
Azul de metileno, campo claro



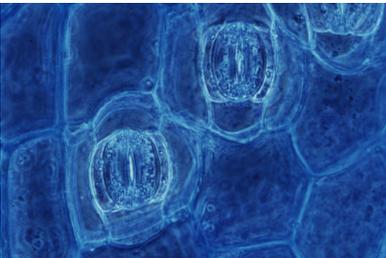
Azul de metileno, luz polarizada



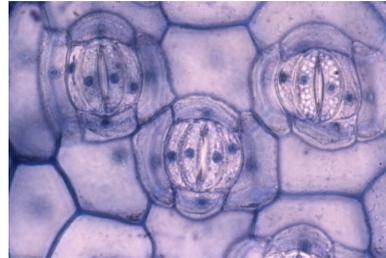
Azul de metileno, contraste diferencial de interferencia



Azul de metileno, contraste diferencial de interferencia



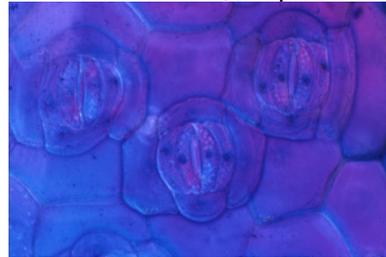
Azul de metileno, contraste de fases



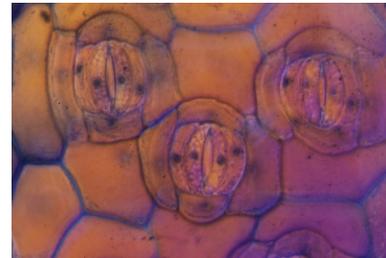
Azul de toluidina O, campo claro



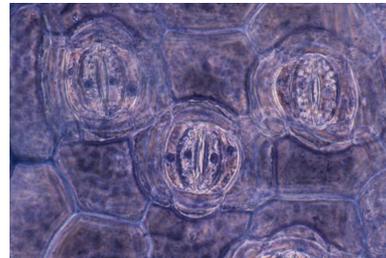
Azul de toluidina O, luz polarizada



Azul de toluidina O, contraste diferencial de interferencia



Azul de toluidina O, contraste diferencial de interferencia

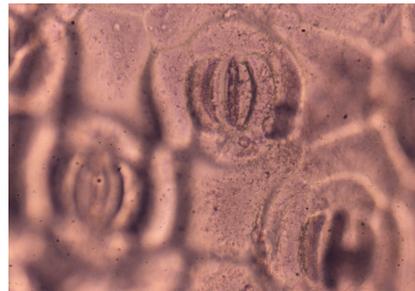


Azul de toluidina O, contraste de fases

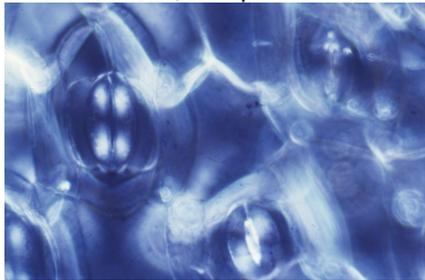
Lámina 1. Microscopía fotónica comparada de epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis*: azul de metileno y azul de toluidina O



Azur A, campo claro



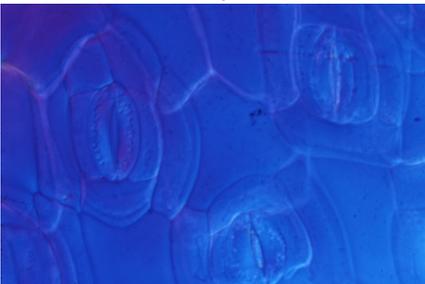
Cianoacrilato, campo claro



Azur A, luz polarizada



Cianoacrilato, contraste diferencial de interferencia



Azur A, contraste diferencial de interferencia



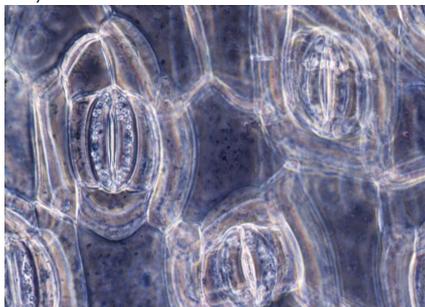
Cianoacrilato, contraste diferencial de interferencia



Azur A, contraste diferencial de interferencia



Cianoacrilato, contraste diferencial de interferencia



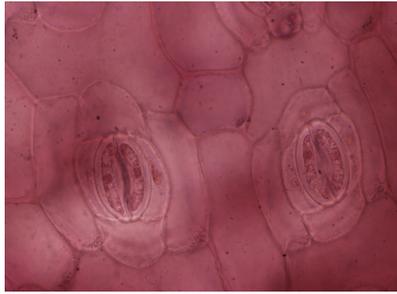
Azur A, contraste de fases



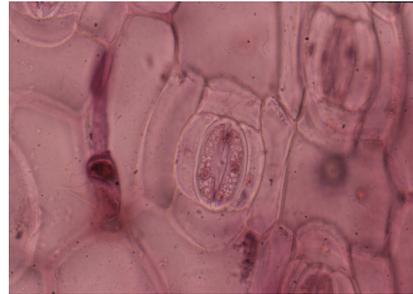
Cianoacrilato, contraste de fases

Lámina 2. Microscopía fotónica comparada de epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis*: Azur A y cianoacrilato

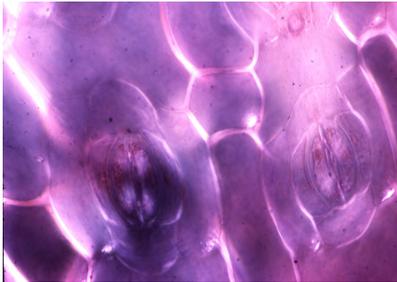
Nota: para la técnica de cianoacrilato no fue posible obtener imágenes con microscopía de luz polarizada



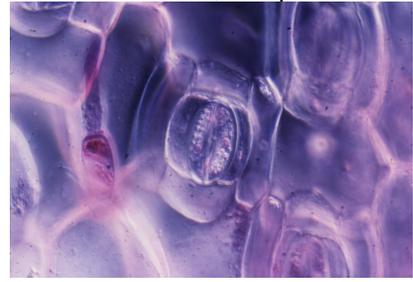
Fucsina ácida, campo claro



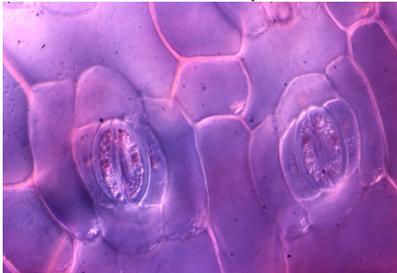
Fucsina ácida, campo claro



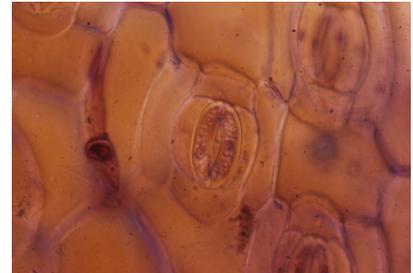
Fucsina ácida, luz polarizada



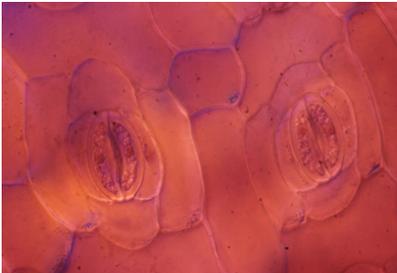
Fucsina ácida, contraste diferencial de interferencia



Fucsina ácida, contraste diferencial de interferencia



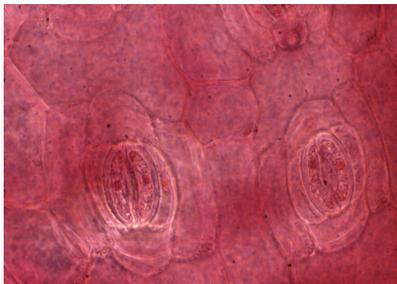
Fucsina ácida, contraste diferencial de interferencia



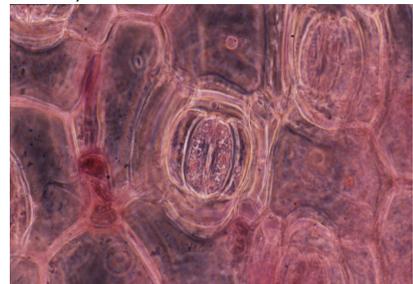
Fucsina ácida, contraste diferencial de interferencia



Fucsina ácida, contraste diferencial de interferencia

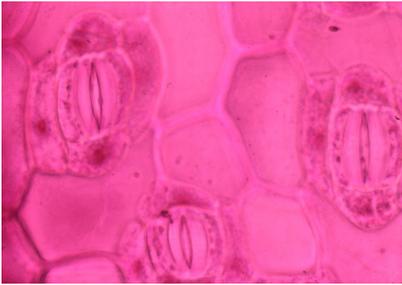


Fucsina ácida, contraste de fases

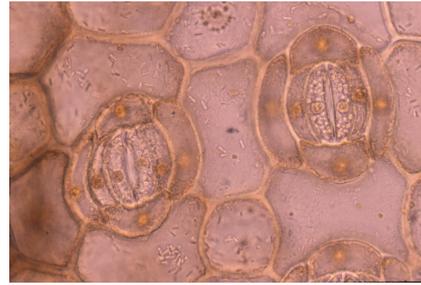


Fucsina ácida, contraste de fases

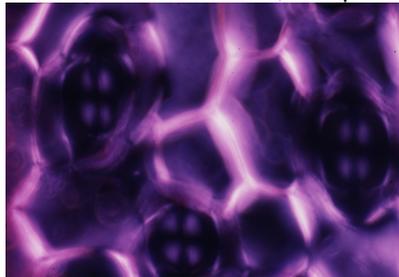
Lámina 3. Microscopía fotónica comparada de epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis*: fucsina ácida



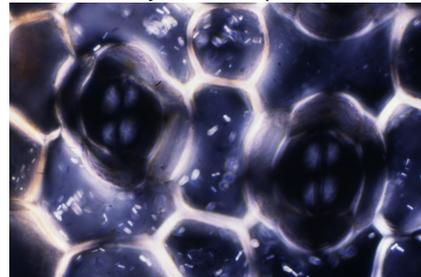
Fucsina básica amoniacal, campo claro



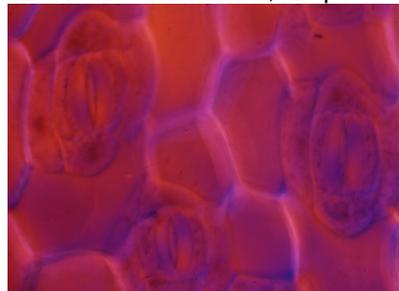
Naranja G, campo claro



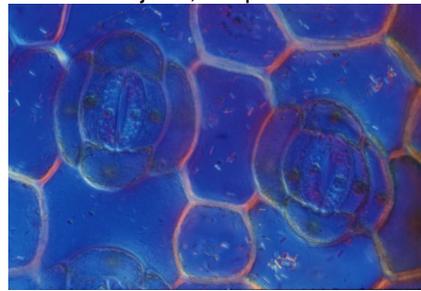
Fucsina básica amoniacal, luz polarizada



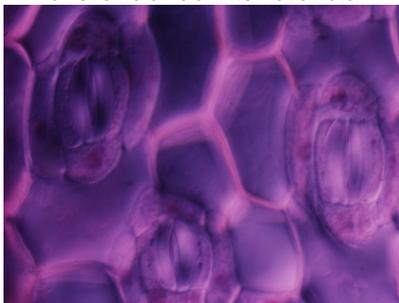
Naranja G, luz polarizada



Fucsina básica amoniacal, contraste diferencial de interferencia



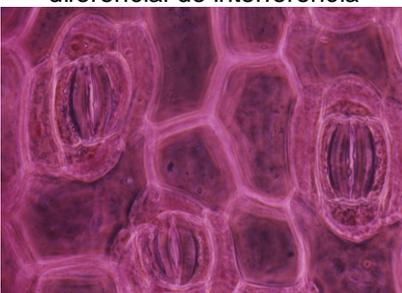
Naranja G, contraste diferencial de interferencia



Fucsina básica amoniacal, contraste diferencial de interferencia



Naranja G, contraste diferencial de interferencia

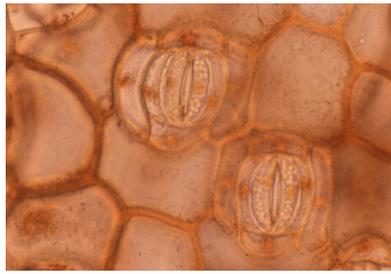


Fucsina básica amoniacal, contraste de fases

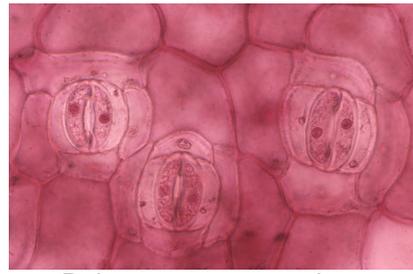


Naranja G, contraste de fases

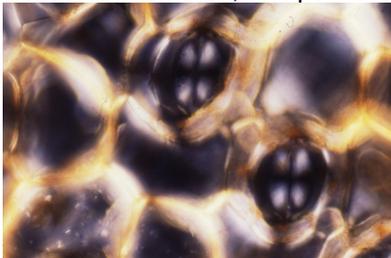
Lámina 4. Microscopía fotónica comparada de epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis*: fucsina básica amoniacal y naranja G



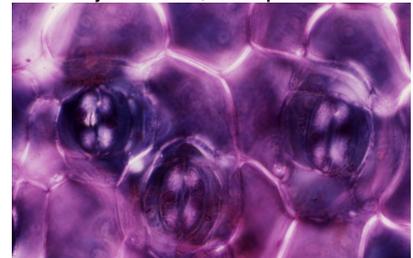
Pardo de Bismarck, campo claro



Rojo neutro, campo claro



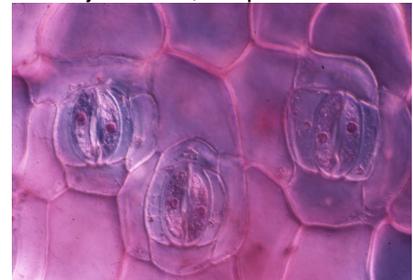
Pardo de Bismarck, luz polarizada



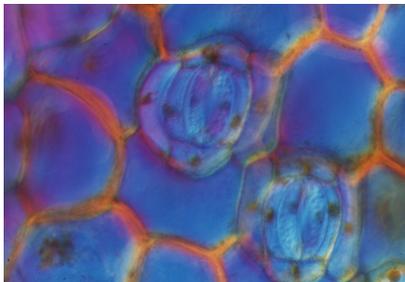
Rojo neutro, luz polarizada



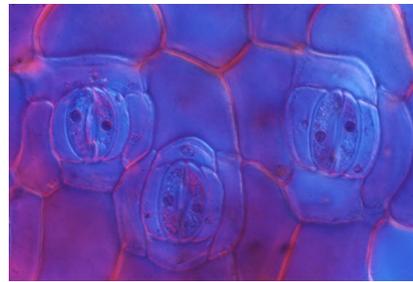
Pardo de Bismarck, contraste diferencial de interferencia



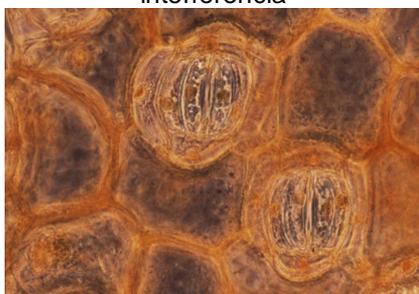
Rojo neutro, contraste diferencial de interferencia



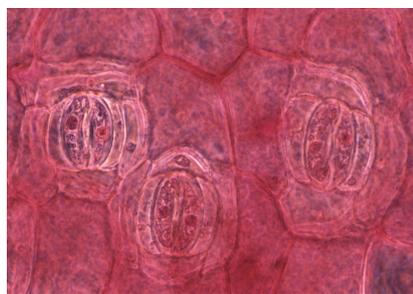
Pardo de Bismarck, contraste diferencial de interferencia



Rojo neutro, contraste diferencial de interferencia



Pardo de Bismarck, contraste de fases



Rojo neutro, contraste de fases

Lámina 5. Microscopía fotónica comparada de epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis*: pardo de Bismarck y rojo neutro

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El esquema metodológico que se llevó a cabo en este trabajo permitió alcanzar los objetivos planteados de modo tal que, en esta sección, pueden ofrecerse diversos comentarios acerca de la epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis* así como del valor de las técnicas histológicas aplicadas y de la microscopía comparada.

En primer lugar, considerando la escasa información que existe sobre estomas de comelináceas, la información aportada en este trabajo es útil y valiosa, pues permite sugerir el uso de la especie como modelo de estudio (ya sea en docencia o investigación) toda vez que ya se han descrito las características de su epidermis foliar abaxial y, en particular, de sus estomas. Puede señalarse que *C. coelestis* es un buen modelo para realizar observaciones de epidermis foliar abaxial, por su fácil manejo para la elaboración de laminillas y por su abundancia de estomas. Como ya se indicaba, el índice estomático de *C. coelestis* es alto, lo que se relaciona con estomas abundantes y estos estomas son no sólo relativamente grandes sino muy homogéneos en su apariencia hexacítica.

Por otra parte, es de interés señalar que los resultados de microtecnica y microscopía en la epidermis foliar abaxial de *Commelina coelestis* permitieron comprobar que el uso de colorantes muy diluidos (concentraciones por debajo del 1%) facilita la preparación de las laminillas y su observación, ya que se evita la sobretinción que diversos autores señalan como uno de los grandes problemas a evitar en la elaboración de laminillas semipermanentes (Gabiño, 1974; Krauss y Audin, 1997).

Pudo apreciarse también que no todos los colorantes hacen resaltar las mismas estructuras celulares, así como tampoco los diferentes sistemas de iluminación ponen en evidencia lo mismo, razón por la cual el presente trabajo demuestra por medio de las fotomicrografías que presenta que las distintas combinaciones de luz y tinción aportan información sumamente valiosa en

estudios sobre Anatomía Vegetal, ya que contrastan de manera diversa la estructura celular.

En cuanto a los colorantes, por ejemplo, puede indicarse lo siguiente: el azul de metileno es un colorante vital muy empleado para observar bacterias y tejidos de plantas superiores con paredes lignificadas y suberificadas, y colorea células vivas y pequeños organismos (D'Ambrogio, 1986). Los resultados del presente trabajo demuestran que también es ideal para observar estructuras celulares como cloroplastos, lámina media, y campos primarios de punteaduras.

El azul de toluidina O, por su parte, es definido como un colorante metacromático ideal para colorear lignina, taninos, paredes primarias y secundarias (Krauss y Audin, 1997). En el caso de *C. coelestis*, aunque la metacromasia no fue evidente, permitió la observación de núcleos, cloroplastos, y lámina media.

El azul A es otro caso interesante ya que, aunque es ampliamente recomendado como colorante nuclear (Lillie, 1977), en *C. coelestis* no sólo resaltó núcleos y nucleolos, sino también lámina media y campos primarios de punteaduras.

La fucsina ácida demostró ser tan útil como lo refiere la literatura, ya que se le recomienda para observar almidón, paredes celulares primarias, lignificadas y cutinizadas, plastidios y núcleos (D'Ambrogio, 1986; Segura, 1990), y en las laminillas de este trabajo resaltó núcleos y nucleolos, cloroplastos, lámina media y campos primarios de punteaduras, es decir, fue una de las tinciones que brindó mayor información.

La fucsina básica, que se recomienda para paredes lignificadas, cutinizadas y suberificadas (Krauss y Audin, 1997), al readquirir su color por efecto del

tratamiento con hipoclorito luego de ser blanqueada con amoníaco, permitió observar núcleos y lámina media en la laminillas en que se le utilizó.

El naranja G y el pardo de Bismarck resultaron ser de gran utilidad para poner en manifiesto la presencia de cristales de oxalato de calcio. Del naranja G se refiere que es un buen colorante citoplasmático (D'Ambrogio, 1986), pero en este caso resaltó núcleos, lámina media y, como ya se indicaba, puso en manifiesto los cristales. El pardo de Bismarck, por su parte, muy utilizado a modo de "contratinción" (Lillie, 1977), mostró un perfil similar al naranja G, especialmente en lo referente a los cristales.

Finalmente, del rojo neutro puede decirse que se enfatiza que colorea tejidos vivos (D'Ambrogio, 1986), y en este caso resaltó núcleos, nucleolos, cloroplastos y lámina media.

Así, en su conjunto, todos y cada uno de los colorantes utilizados demostraron ser útiles para la observación de los caracteres de la epidermis foliar abaxial de *C. coelestis*, dato que es valioso considerando que en los libros de microtecnia las técnicas para epidermis suelen no ser muy variadas en cuanto a los colorantes que se usan. Así, para el principiante, el que aparentemente se tenga que utilizar un cierto colorante, puede limitar mucho su trabajo, especialmente cuando dicho colorante por alguna razón no se encuentra disponible. El abanico de opciones de tinción que aquí se presenta ha de permitir, a quien consulte el presente trabajo, hacer una elección fundamentada de con qué teñir siempre considerando que pueden llegar a haber variaciones en los resultados de acuerdo a la naturaleza del material por procesar.

En este sentido, la técnica de cianoacrilato, que permite obtener la "huella" de la superficie de la epidermis, es un complemento ideal de las técnicas de disociado y tinción, ya que permite observar completas estructuras como los tricomas, así como los patrones de distribución de éstos y de los estomas. Del

mismo modo, el aplicar distintos sistemas de microscopía fotónica a una laminilla permite obtener una visión más completa de la estructura de la epidermis, ya que lo que en un sistema puede no verse y enmascararse en otro, en un tercer sistema alternativo puede hacerse evidente tal y como se aprecia en los cuadros presentados en los resultados. Cabe enfatizar que cada sistema de microscopía fotónica tiene sus ventajas y sus desventajas, pero que es en conjunto, desde el punto de vista comparativo, que los resultados se enriquecen mediante su uso. Un detalle interesante es que si bien, por ejemplo, el contraste diferencial de interferencia se recomienda para material sin teñir, el que se utilicen colorantes muy diluidos no evita que se obtengan excelentes resultados de la aplicación de este sistema de microscopía fotónica, tal y como se aprecia en algunas de las fotomicrografías presentadas.

Puede así ofrecerse, a manera de conclusión general de este trabajo, la reflexión de que en cuestión de estudios de Anatomía Vegetal todavía hay mucho que se puede innovar desde el punto de vista técnico. La aplicación de la microtecnia y de los sistemas de microscopía fotónica va más allá de las “recetas”, ya que requiere de un acercamiento fundamentado y creativo. El uso novedoso de colorantes clásicos en combinación con algunos de los más sofisticados sistemas de microscopía fotónica es una herramienta de gran trascendencia cuyo valor debe de aquilatarse de cara a los resultados tan llamativos que se han obtenido en este trabajo con *C. coelestis*.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- n Arnold, C.R., P.J. Rolls y J.C.J. Stewart. 1974. *Fotografía Aplicada*. Editorial Omega. Barcelona.
- n Arredondo, J.A. y A. Martínez. 1978. Microscopia óptica en el estudio de protozoarios de vida libre. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- n Azure A for Mast Cells Staining Protocol, 2005: disponible en http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/azure-a_ellis.htm
- n Batianoff, G.N. y D.W. Butler. 2002. Assesment of invasive naturalised plants in south-east Queensland. *Plant Protection Quarterly* vol. 17, no. 1.
- n Bennett, A., Osterberg, H, Jupnik, H. and Richards, O. 1951. *Phase Microscopy: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- n Bergeron, J.A. y M. Singer. 1958. Metachromasy: an experimental and theoretical reevaluation. *J. Biophysic. And Biochem. Cytol.* 4(4).
- n Biological Stain Commission, 2006: disponible en http://www.science-education.org/classroom_activities/chlorine_compound/methylene_blue.html
- n Burns, J.H. 2004. Comparison of invasive and non-invasive dayflowers (Commelinaceae) across experimental nutrient and water gradients. *Diversity & Distributions* Volume 10 Issue 5-6 Page 387.
- n Casartelli, J.D. 1974. *Microscopia teórico-práctica*. Editorial Irmo, S.A. España.
- n Croxdale, J. 1998. Stomatal patterning in monocotyledons: *Tradescantia* as a model system. *J. Exp. Bot.* 49, special issue: 279: 292.
- n CRScientific, 2006: disponible en <http://www.crscientific.com/microscope-stain.html>
- n Chase, M.W. 2004. Monocot relationships: an overview. *Am. J. Bot.* 91(10): 1645-1655.
- n D´Ambrogio, A. 1986. *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Editorial hemisferio Sur, S.A. Argentina.

no existiendo acuerdo sobre cómo citar las fuentes electrónicas lo que aquí se ofrece es el nombre de la página o autor (si lo hay), fecha de la página o fecha de consulta (si es que la página no tiene fecha), y dirección electrónica en la que se encuentra disponible la información.

- n Davidson, M.W. y M. Abramowitz. 1999. Optical Microscopy Review Article. Versión electrónica disponible en <http://www.olympusmicro.com/primer/opticalmicroscopy.html>
- n Evans, T.M., R.B. Faden, M.G. Simpson, K.J. Sytsma. 2000. Phylogenetic relationships of the Commelinaceae: I. A cladistic analysis of morphological data. *Systematic Botany* 25(4): 668-691.
- n Gabiño, G. 1974. *Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo*. Editorial Limusa. México.
- n Hipertextos del Área de la Biología, 2006: disponible en <http://www.biologia.edu.ar/microscopia/microscopia1.htm>
- n Histopathology Recipe Formulary, 2006: disponible en http://www.hoslink.com/histo/histo_recipes.htm
- n Historia del Microscopio, 2006: disponible en <http://personales.mundivia.es/mggalvez/micro2.htm>
- n History of the Biological Stain Commission, 2006: disponible en http://www.biostains.org/new_page_3.htm
- n Howey, 2000: disponible en <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artfeb00/rhvital.html>
- n Kelly, D. & Skipworth, J. P. 1984b. *Tradescantia fluminensis* in a Manawatu (N.Z.) forest remnant: II. Control by herbicides. *New Zealand Journal of Botany*, 22, 399-402.
- n Kelly, D. y Skipworth, J. P. 1984a. *Tradescantia fluminensis* in a Manawatu (N.Z.) forest remnant: I. Growth and reproduction. *New Zealand Journal of Botany*, 22, 393-397.
- n Kelly, J.W. y L. Chang. 1969. Thermal analysis of polyanion metachromasy: temperature effects on stained cells, tissues and models. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 658 - 667.
- n Krauss, J.E. y M. Audin, 1997. *Manual Básico de Métodos en Morfología Vegetal*. Editorial Edur. Brasil.

- n Lillie, R.D. 1977. *H.J. Conn's Biological Stains, 9th edition*. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.
- n Luque, R. Y J. Estrada. 2005. Anatomía de Commelinaceae presentes en un cultivo de papas (*Solanum tuberosum* L.) en Mérida, Venezuela. *Acta Bot. Venez.* [online]: vol.28, no.2.
- n Meier, M. 2004. The Optical Microscope. Department of Chemical Engineering and Materials Science. University of California Davies. Versión en línea.
- n MerckSource, 2006: disponible en http://www.mercksource.com/pp/us/cns/cns_hl_dorlands.jspzQzpqzEzzSzppdocszSzuszSzcommonzSzdorlandzSzdorlandzSzdm m_11zPzhtm
- n Nikon Introduction to Microscopes, 2006: disponible en <http://www.coolscope.com/eng/tech/1-0-4.aspx>
- n Nikon MicroscopyU: Phase Contrast Microscopy, 2006: disponible en <http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasehome.html>
- n Nikon MicroscopyU: Polarized Light Microscopy, 2006: disponible en <http://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedintro.html>
- n O'Brien, T.P. y M.E. McCully, 1981. *The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods*. Termacarphi. Melbourne.
- n Olympus Microscopy Resource Center: Differential Interference Contrast, 2006: disponible en <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dichome.html>
- n Olympus Microscopy Resource Center: Polarized Light Microscopy, 2006: disponible en <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/polarized/polarizedhome.html>
- n Optical Microscope Primer: Anatomy of the Microscope, 2006: disponible en <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/illuminationhome.html>
- n Optical Microscopy Primer: Specialized Techniques, 2006: disponible en <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/phasecontrast/phaseindex.html>
- n Pequeño Larousse Ilustrado. 2000. Agrupación Editorial, S.A. Colombia.
- n PROCYMAF-SEMARNAP, 2000: disponible en <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/CommelinaCoelestis.html>

- n Rudall, P.J., W. Stuppy, J. Cunniff, E.A. Kellogg, y B.G. Briggs. 2005. Evolution of reproductive structures of grasses (Poaceae) inferred by sister-group comparison with their putative closest living relatives, Ecdociaceae. *Am. J. Bot.* 92(9): 1432-1443.
- n Ruzin, S.E. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press. New York.
- n Rzedowski, J. y G. Calderón de Rzedowski. 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México, 2ª edición*. Instituto de Ecología, A.C. México.
- n Science, Optics & You, 2006: disponible en <http://micro.magnet.fsu.edu/optics/olympusmicd/anatomy/index.html>
- n Segura, M. 1990. *Manual de laboratorio: citología y citogenética*. Editorial Trillas. México.
- n SEMARNAP: especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino, 2006: disponible en <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/CommelinaCoelestis.html>
- n StainsFile, 2006: disponible en <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/52015.htm>
- n Standish, R.J. 2001. Prospects for biological control of *Tradescantia fluminensis* Vell. (Commelinaceae). Doc Science Internal Series 9, Department of Conservation, New Zealand.
- n Standish, R.J. 2002. Experimenting with methods to control *Tradescantia fluminensis*, an invasive weed of native forests remnants in New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology* 26(2): 161-170.
- n The Perspective View, 2007: disponible en <http://www.museumonline.at/1997/schulen/bq10/english/perspect.htm>
- n Timeline – History of Microscopes, 2006: disponible en <http://inventors.about.com/od/mstartinventions/a/microscopes.htm>
- n Tomlinson, P.B. 1966. Anatomical data in the classification of Commelinaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 59: 371-395.
- n Vision Engineering: Microscope History, Science Technology, 2006: disponible en http://www.visioneng.com/technology/microscope_history.htm

- n Vocabulary for Desiderius Erasmus, 2007: disponible en <http://www.stoa.org/hopper/vocab.jsp?doc=Stoa:text:2003.02.0006:colloquium=1:topic=3>
- n Weyers, J.D.B. y A.J, Travis. 1981. Selection and Preparation of Leaf Epidermis for Experiments on Stomatal Physiology. *J. Exp. Bot.*. 32: 837-850.
- n Willmer, C. 1983. *Stomata*. Chapman & Hall. London.